



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

CURSO ACADÉMICO 2020-2021

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Implicación de la familia de miARNs *miR-200* en la
adipogénesis

Vanesa López Sobrado

22/07/2021

Tutora: Susana Sangiao Alvarellos

Índice

Índice de figuras	I
Índice de tablas	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
1. Introducción	1
1.1. Obesidad	1
1.1.1. ¿Qué es la obesidad? Definición y problemática	1
1.1.2. Tejido adiposo	3
1.1.3. Hipertrofia e hiperplasia en la adipogénesis	5
1.1.4. Adipogénesis y factores de transcripción	7
1.2. microARNs (miARNs)	8
1.2.1. ¿Qué son?	8
1.2.2. Ruta de síntesis y degradación	9
1.2.3. Implicación de los miARNs en la adipogénesis y en la obesidad	10
1.3. La familia <i>miR-200</i>	12
1.4. Línea celular 3T3-L1	13
2. Objetivos	15
3. Material y métodos	16
3.1. Línea celular	16
3.2. Cultivos celulares	19
3.3. Western blot (WB)	28

Índice

3.3.1.	Extracción de proteínas.....	29
3.3.2.	Cuantificación de proteínas.....	29
3.3.3.	Electroforesis <i>SDS-PAGE</i>	30
3.3.4.	Transferencia	31
3.3.5.	Incubación e inmunodetección.....	32
3.3.6.	Análisis estadístico.....	33
4.	<i>Resultados y discusión</i>	34
4.1.	Experimento 1. Resultado de la sobreexpresión de <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> en la adipogénesis	35
4.2.	Experimento 2. Resultado de la inhibición de <i>miR-200b</i> en la adipogénesis	38
4.3.	Experimento 3. Resultado de la sobreexpresión de <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> en la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis <i>de novo</i>.....	41
4.4.	Experimento 4. Resultado de la inhibición de <i>miR-200b</i> en la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis <i>de novo</i>.....	45
5.	<i>Conclusiones</i>	49
6.	<i>Bibliografía</i>	50

Índice de figuras

Figura 1. Localización y funciones de los distintos depósitos adiposos en el ser humano	4
Figura 2. Características de los adipocitos hipertróficos e hiperplásicos ...	6
Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la cascada de acontecimientos que tienen lugar durante la adipogénesis	8
Figura 4. Ruta general de síntesis de los miARNs	9
Figura 5. Síntesis y liberación de los miARNs al ambiente extracelular...	10
Figura 6. Dos maneras de diferenciar los clusters de la familia <i>miR-200</i> (17).	13
Figura 7. Vector lentiviral empleado como control en los estudios de sobreexpresión	17
Figura 8. Vector lentiviral empleado como control en los estudios de inhibición.....	18
Figura 9. Vector lentiviral empleado para la creación de células 3T3-L1 que sobreexpresan <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i>	18
Figura 10. Vector lentiviral empleado para la creación de células 3T3-L1 con valores de <i>miR-200b</i> inhibidos.....	19
Figura 11. Ejemplo de una placa de cultivo p100	20
Figura 12. Ejemplo de una placa de cultivo de 12 pocillos (p12)	21
Figura 13. Línea temporal y medios de cultivo utilizados para la diferenciación de las células 3T3-L1.	22
Figura 14. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que sobreexpresan <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> en la placa p12	23
Figura 15. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que inhiben <i>miR-200b</i> en la placa p12.....	25
Figura 16. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que sobreexpresan <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> con y sin insulina en la placa p12	26

Índice de figuras

Figura 17. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que inhiben <i>miR-200b</i> con y sin insulina en la placa p12	28
Figura 18. Fotografías de células 3T3-L1 control (A) y con sobreexpresión de <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> (B) 7 días después de inducir la adipogénesis ..	36
Figura 19. Fotografías de las células 3T3-L1 con tinción Oil Red-O control (A) y con sobreexpresión de <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> (B) 7 días después de inducir la adipogénesis a un aumento de 10X.....	37
Figura 20. Niveles de absorbancia, (OD) del Oil Red-O extraído de los dos grupos de células representadas en la Figura 19.....	38
Figura 21. Fotografías de células 3T3-L1 control (A) y con inhibición de <i>miR-200b</i> (B) 7 días después de inducir la adipogénesis.....	39
Figura 22. Fotografías de las células 3T3-L1 con tinción Oil Red-O control (A) y con inhibición de <i>miR-200b</i> (B) 7 días después de inducir la adipogénesis a un aumento de 10X	40
Figura 23. Niveles de absorbancia, (OD) del Oil Red-O extraído de los dos grupos de células representadas en la Figura 22.....	41
Figura 24. Western blot representativo de las proteínas FAS, pAKT, pACC, pAMPK y β -actina en células 3T3-L1 control y con los miARNs <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> sobreexpresados con y sin tratamiento con insulina (100 nM durante 5 minutos).....	42
Figura 25. Expresión proteica de las enzimas pAKT, pAMPK, pACC y FAS en células 3T3-L1 control (CS) y con los miARNs <i>miR-141</i> y <i>miR-200c</i> sobreexpresados (SOBR).....	44
Figura 26. Western blot representativo de las proteínas FAS, pAKT, pACC, pAMPK y β -actina en células 3T3-L1 control y con el miARN <i>miR-200b</i> inhibido con y sin tratamiento con insulina (100 nM durante 5 minutos) ..	45
Figura 27. Expresión proteica de las enzimas pAKT, pAMPK, pACC y FAS en células 3T3-L1 control (CI) y con el miARN <i>miR-200b</i> inhibido (INHIBI).	47

Índice de tablas

Tabla I. Criterios de la OMS para definir la obesidad en diferentes grados en función del IMC (5).....	2
Tabla II. Casos de obesidad humana debidos a mutaciones puntuales (6).	3
Tabla III. Algunos miARNs de importancia metabólica en diferentes tejidos	12
Tabla IV. Cantidades utilizadas de los reactivos para la fijación, tinción y elución de las células con Oil Red-O	24
Tabla V. Reactivos necesarios para la preparación de los geles	31
Tabla VI. Anticuerpos primarios y secundarios usados y sus diluciones .	33

Abreviaturas

3'UTR	Regiones 3' no traducidas
ACC	Acetil Coenzima A carboxilasa
ADD1	Factor 1 de determinación y diferenciación de adipocitos
Ago2	Argonauta 2
AKT	Proteína quinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATM	Macrófagos del tejido adiposo
ATP	Adenosín trifosfato
<i>BAT</i>	Tejido adiposo pardo
<i>BSA</i>	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
<i>CEBP</i>	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein</i>
CI	Control inhibitor
CN	Control negativo
CoA	Coenzima A
cop	Copépodo
CS	Control sobreexpresante
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
<i>DMEM</i>	Medio Dulbecco modificado
ECmiARN	MicroARN extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido egtázico
<i>EMT</i>	Transición epitelio-mesenquima

Abreviaturas

FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos de tipo 4
FAS	Ácido graso sintasa
FBS	Suero bovino fetal
FFA	Ácidos grasos libres
GFP	Proteína verde fluorescente
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
G0	Fase de arresto celular
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
I200	Inhibidor <i>miR-200</i>
KO	<i>Knockout</i>
miARN	MicroARN
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
pACC	Acetil Coenzima A carboxilasa fosforilada
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
pAMPK	Proteína quinasa activada por AMP fosforilada
PBS	Tampón fosfato salino
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>

Abreviaturas

<i>P/S</i>	Penicilina/streptomicina
<i>SAT</i>	Tejido adiposo subcutáneo
<i>SDS</i>	Sulfato de Sodio Dodecílico
<i>SREBP-1</i>	Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
<i>SVF</i>	Fracción vascular estromal
<i>S200</i>	Sobreexpresante <i>miR-200</i>
<i>TBS</i>	Tampón tris-salino
<i>U</i>	Uracilo
<i>UCP-1</i>	Proteína desacoplante 1
<i>VAT</i>	Tejido adiposo visceral
<i>WAT</i>	Tejido adiposo blanco
<i>WB</i>	<i>Western blot</i>

Resumen

Implicación de la familia de miARNs *miR-200* en la adipogénesis

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs endógenos de 18-24 nucleótidos, no codificantes y que tienen la capacidad de silenciar el ARNm regulando transcripcionalmente la expresión génica. Durante las últimas décadas, las tasas de obesidad se han incrementado en todo el mundo, no siendo España una excepción. En la obesidad, el proceso de adipogénesis determina en gran medida el número de adipocitos en los depósitos de grasa corporal. En este trabajo se estudió la implicación de la familia *miR-200* en la adipogénesis y la ruta de la señalización de la insulina. Para ello, se usó la línea celular 3T3-L1 tratada previamente con factores lentivirales para sobreexpresar *miR-141* y *miR-200c* e inhibir *miR-200b*. Posteriormente se indujo la adipogénesis y se observó su diferenciación durante siete días. Se cuantificó la cantidad de triglicéridos gracias a una tinción de Oil Red-O y se analizó la expresión proteica de proteínas clave de la ruta de señalización de la insulina y de la lipogénesis *de novo*. Los resultados muestran que altos niveles de *miR-141* y *miR-200c* disminuyen el número de adipocitos maduros y la cantidad de triglicéridos, mientras que la inhibición de *miR-200b* provoca el efecto contrario. La sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* provoca que no se produzcan aumentos estadísticamente significativos en pAKT tras el tratamiento con insulina, efecto contrario al producido al inhibir *miR-200b*.

En base a estos datos se puede concluir que la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* produce una inhibición de la adipogénesis y un empeoramiento en la ruta de señalización de la insulina y, por el contrario, la inhibición de *miR-200b* provoca una estimulación de la adipogénesis y un aumento de la sensibilidad a la insulina, sugiriendo una implicación de la familia *miR-200* en ambas rutas.

Resumo

Implicación da familia de miARNs *miR-200* na adipoxénese

Os microARNs (miARNs) son pequenos ARNs endóxenos de 18-24 nucleótidos, non codificantes e que teñen a capacidade de silenciar o ARNm regulando transcricionalmente a expresión xénica. Durante as últimas décadas, as taxas de obesidade incrementáronse en todo o mundo, non sendo España unha excepción. Na obesidade, o proceso de adipoxénese determina en gran medida o número de adipocitos nos depósitos de graxa corporal. Neste traballo estudouse a implicación da familia *miR-200* na adipoxénese e a ruta de sinalización da insulina. Para elo, usouse a liña celular 3T3-L1 tratada previamente con factores lentivirais para sobreexpresar *miR-141* e *miR-200c* e inhibir *miR-200b*. Posteriormente induciuse a adipoxénese e observouse a súa diferenciación durante sete días. Cuantificouse a cantidade de triglicéridos grazas a unha tinguadura de Oil Red-O e analizouse a expresión proteica de proteínas clave da ruta de sinalización da insulina e da lipoxénese *de novo*. Os resultados mostran que altos niveis de *miR-141* e *miR-200c* diminúen o número de adipocitos maduros e a cantidade de triglicéridos, mentres que a inhibición de *miR-200b* provoca o efecto contrario. A sobreexpresión de *miR-141* e *miR-200c* provoca que non se produzan aumentos estatisticamente significativos en pAKT tralo tratamento con insulina, efecto contrario ao producido ao inhibir *miR-200b*.

En base a estes datos pódese concluír que a sobreexpresión de *miR-141* e *miR-200c* produce unha inhibición da adipoxénese e un empeoramento na ruta de sinalización da insulina e, polo contrario, a inhibición de *miR-200b* provoca unha estimulación da adipoxénese e un aumento da sensibilidade á insulina, suxerindo unha implicación da familia *miR-200* en ambas rutas.

Abstract

Implication of *miR-200* family of miARNs in adipogenesis

MicroARNs (miARNs) are endogenous small noncoding RNAs of 18-24 nucleotides, that have the capability to silence ARNm by genic expression transcriptionally regulation. During last decades, obesity rates have growth worldwide, not being Spain an exception. In obesity, adipogenesis process determines largely the adipocytes number in body fat depots. In this work the implication of *miR-200* family in adipogenesis and the insulin signaling pathway were studied. For this, 3T3-L1 cell line previously treated with lentiviral factors to overexpress *miR-141* and *miR-200c* and to inhibit *miR-200b* was used. Afterwards adipogenesis was inducted and its differentiation was followed for seven days. The amount of triglycerides was quantified by Oil Red-O stain and the protein expression of key proteins in insulin signaling pathway and lipogenesis *de novo* was analyzed. Results show that high levels of *miR-141* and *miR-200c* decrease the number of mature adipocytes and triglycerides quantity, while the inhibition of *miR-200b* causes the opposite effect. The overexpression of *miR-141* y *miR-200c* causes no statistically significant increases in pAKT to occur after treatment with insulin, the opposite effect to that produced by inhibiting *miR-200b*.

Based on these data it can be concluded that *miR-141* and *miR-200c* overexpression produces an adipogenesis inhibition and a worsening of insulin signaling pathway and, on the contrary, *miR-200b* inhibition causes an adipogenesis stimulation and an insulin sensitivity increase, suggesting and implication of *miR-200* family in both pathways.

1. Introducción

1.1. Obesidad

1.1.1. ¿Qué es la obesidad? Definición y problemática

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años (39 %) padecían sobrepeso y más de 650 millones (13 %) eran obesos. La mayor parte de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que la insuficiencia ponderal (1).

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que afecta a más de 650 millones de personas en todo el mundo. En los últimos tiempos los avances tecnológicos han propiciado que el estilo de vida sea más sedentario, realizando poca o nula actividad física, así como descuidando la nutrición (dieta elevada en hidratos de carbono y grasas). A grandes rasgos se puede decir que su aparición se debe a un desbalance o desequilibrio calórico entre la ingesta y el gasto energético, lo que provoca una acumulación excesiva de grasa en el organismo. Esta acumulación de grasa puede ser perjudicial para la salud provocando distintas comorbilidades entre las que podemos incluir la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensión, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, ciertos tipos de cáncer y apnea del sueño e incluso se ha relacionado con demencia y fallo cognitivo (1).

Todas estas enfermedades asociadas a la obesidad han conseguido que en España ésta sea la segunda causa de muerte prematura (y evitable) después del tabaco, aunque en pocos años la obesidad y el sobrepeso pasarán a convertirse en la primera causa (2). La obesidad implicaba en 2011, según el estudio DELPHI, un coste económico de unos 2882,3

Introducción

millones de euros anuales, coste que probablemente haya aumentado debido al gran aumento de la obesidad en los últimos años (3).

Aunque la obesidad es un exceso de masa grasa, para su diagnóstico en la práctica clínica se utiliza el Índice de Masa Corporal (IMC), que relaciona la altura con el peso; la OMS establece que un paciente adulto presenta obesidad con un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ siendo $IMC = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{altura}^2(\text{m}^2)}$ (4).

La clasificación según los criterios de la OMS para definir obesidad y sus diferentes grados en función del IMC se muestra en la *Tabla I* (5).

Tabla I. Criterios de la OMS para definir la obesidad en diferentes grados en función del IMC (5).

Grado	Clasificación	IMC	Riesgo comorbilidad
	Normopeso	18,5-24,9	Normal
I	Sobrepeso	25-29,9	Incrementado
II	Obesidad leve	30-34,9	Moderado
III	Obesidad moderada	35-39,9	Alto
IV	Obesidad severa	> 40	Muy alto

En la mayor parte de pacientes con obesidad es difícil establecer una única causa de esta enfermedad, ya que se debe tanto a factores genéticos como ambientales. Existe un número reducido de casos en los que la obesidad se debe a mutaciones puntuales tal como se puede ver en la *Tabla II*, donde se detallan los genes candidatos de estas mutaciones, así como sus productos y localización cromosómica (6).

Introducción

Tabla II. Casos de obesidad humana debidos a mutaciones puntuales (6).

Gen candidato	Producto	Localización cromosoma
LEP	Leptina	7q31.3
LEPR	Receptor de leptina	1p31
POMC	Proopiomelanocortina	2p23.3
PCSK1	Prohormona convertasa-1	5q15-q21
CRHR1	Receptor-1 de CRH	17q12-q22
CRHR2	Receptor-2 de CRH	7p14.3
MCR3	Receptor-3 de melanocortina	20q13.2-q13.3
MCR4	Receptor-4 de melanocortina	18q22
GPR24	<i>G-protein-coupled receptor 24</i> (receptor 1 de la hormona concentradora de melanina)	22q13.2
SIM1	<i>Single minded homologue-1</i>	6q16.3-q21
NTRK2	Receptor 2 de tirosín-quinasa neurotrófica	9q22.1

1.1.2. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un tipo de tejido conjuntivo formado por diferentes tipos celulares como adipocitos maduros, preadipocitos y células inmunes. Se forma mediante la unión de los adipocitos gracias a fibras reticulares (colágeno tipo III). Estas células unidas constituyen los llamados lóbulos adiposos (7). La función clásica del tejido adiposo es almacenar el exceso de energía en forma de grasa, proceso que llevan a cabo los adipocitos. Pero, además, se sabe que el tejido adiposo funciona como un verdadero órgano endocrino ya que secreta más de 600 moléculas diferentes llamadas adipoquinas, con funciones pleiotrópicas que regulan, entre otros procesos, el metabolismo. Entre las hormonas más estudiadas del tejido adiposo podemos mencionar la leptina y la adiponectina (8) (9).

Se pueden diferenciar tres tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (*WAT*, del inglés *White Adipose Tissue*), el tejido adiposo pardo (*BAT*, del

Introducción

inglés *Brown Adipose Tissue*) y el tejido adiposo beis que últimamente ha captado la atención de los investigadores debido a su potencial para combatir la obesidad y la diabetes asociada (9).

Anatómicamente, la grasa blanca se puede dividir en dos grandes depósitos: el subcutáneo (*SAT*, del inglés *Subcutaneous Adipose Tissue*) y el visceral (*VAT*, del inglés *Visceral Adipose Tissue*) que se encuentra alrededor de los órganos internos (*Figura 1*). En la obesidad, un exceso de *VAT* está estrechamente relacionado con complicaciones metabólicas como la resistencia a la insulina y la DM2 (7).

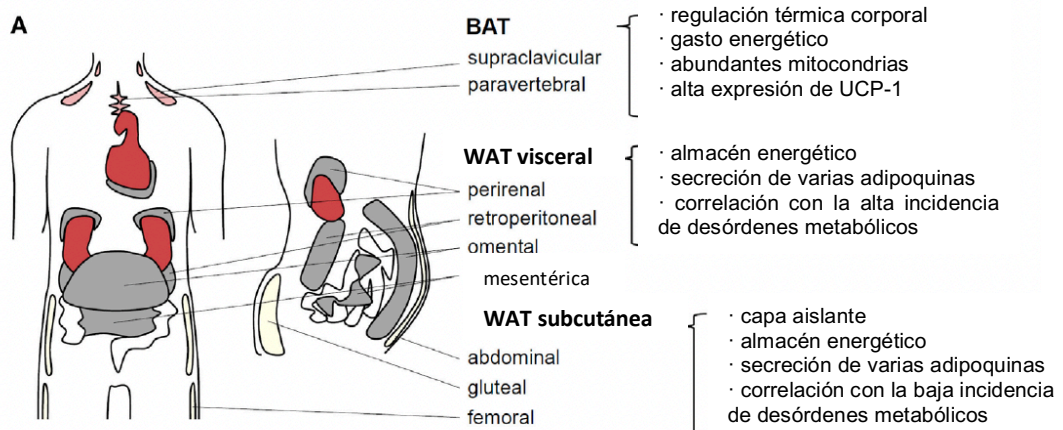


Figura 1. Localización y funciones de los distintos depósitos adiposos en el ser humano. Tomada y modificada de (7).

La composición y función principal de todos los tejidos adiposos presentes en el ser humano se exponen a continuación:

- **WAT**: formado principalmente por adipocitos maduros y por la fracción vascular estromal (*SVF*). Su función fisiológica principal es la de almacenamiento de energía en forma de lípidos, ácidos grasos libres (*FFA*) y glicerol, almacenados como triglicéridos en los adipocitos. Cuando otros tejidos u órganos necesitan energía, estos lípidos son hidrolizados y los *FFA* se liberan a la circulación. El *WAT* tiene importantes funciones metabólicas, endocrinas e inmunes, que

Introducción

regulan procesos fisiológicos mediante la secreción de adipoquinas. La obesidad y la alteración de la función del *WAT* da lugar a una acumulación de lípidos en tejidos ectópicos, promoviendo el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas (9).

- *BAT*: este tejido adiposo es termogénico, regula la temperatura corporal gastando energía derivada de los lípidos para producir calor, también tiene un papel activo en la secreción de adipoquinas y factores con acciones paracrinas y endocrinas. En humanos adultos se encuentra en cinco depósitos: interescapular, mediastinal, perirrenal, axilar y cervical. Los depósitos de este tejido adiposo se pueden activar mediante frío y se caracteriza por tener pequeños lípidos en forma de gotas y un alto número de mitocondrias, lo que le proporciona su color marrón característico (9).
- Tejido adiposo Beis: este tejido adiposo es un tipo de tejido intermedio entre el blanco y el pardo y se encuentra en los depósitos del *WAT*, donde los adipocitos blancos se pueden convertir en adipocitos como los marrones. Este tejido comparte características y funciones morfológicas, moleculares y termogénicas con el típico *BAT*. La plasticidad del *WAT* y del tejido adiposo beis juega un papel importante ya que se han documentado procesos bidireccionales de interconversión entre *WAT* y tejido adiposo beis (9).

1.1.3. Hipertrofia e hiperplasia en la adipogénesis

En la obesidad la expansión de los adipocitos se puede deber a dos fenómenos: hipertrofia o hiperplasia. La hipertrofia es el aumento del tamaño de los adipocitos ya presentes y la hiperplasia es la aparición o creación de nuevos adipocitos, es decir, un aumento en el número de adipocitos. Estos dos fenómenos se pueden observar en la *Figura 2* (7).

Introducción

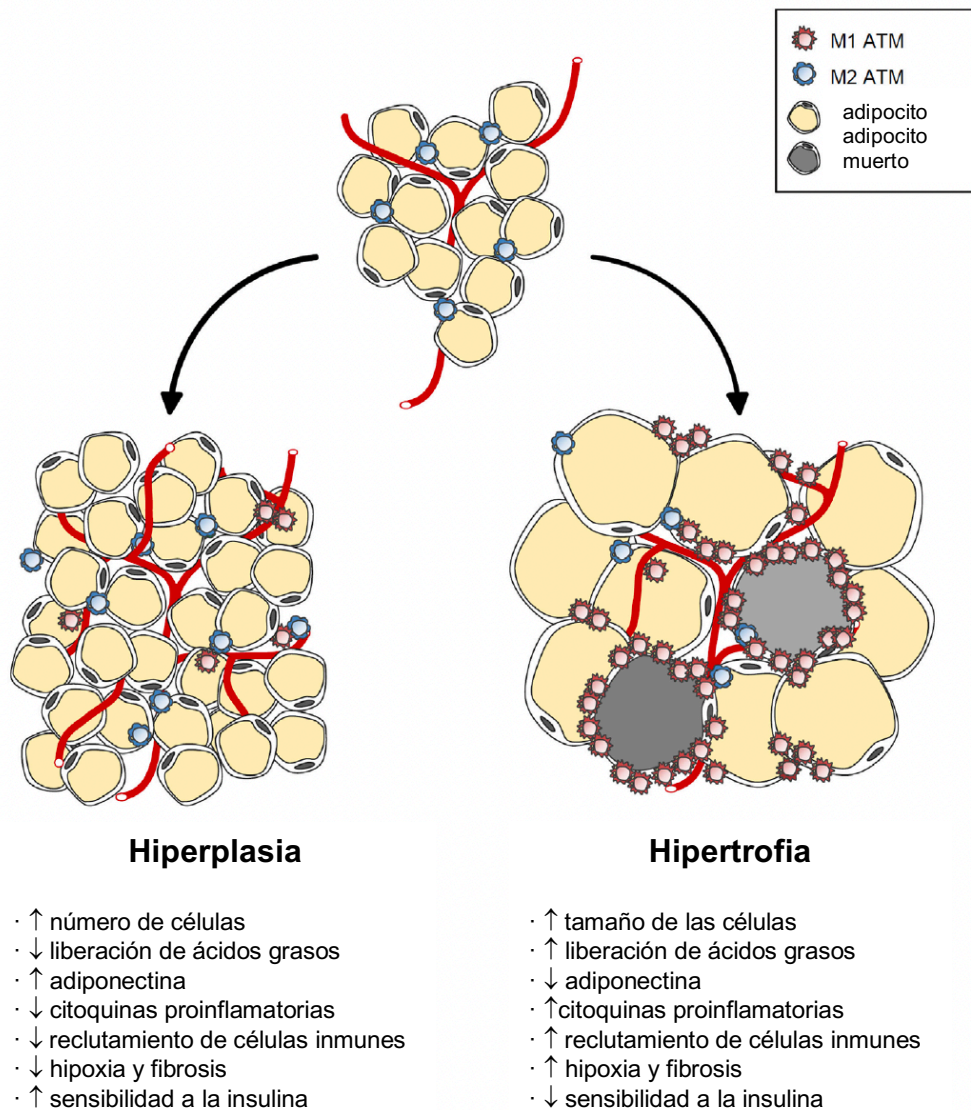


Figura 2. Características de los adipocitos hipertróficos e hiperplásicos. Tomada y modificada (7).

Tal como se especifica en la *Figura 2*, durante el fenómeno de hiperplasia aumenta el número de adipocitos, la síntesis de adiponectina y la sensibilidad a la insulina, mientras que disminuye la liberación de ácidos grasos en el organismo, las citoquinas proinflamatorias (producidas por los macrófagos del tejido adiposo, ATM, de tipo M1), el reclutamiento de células inmunes, la hipoxia y la fibrosis. Por el contrario, en la hipertrofia aumenta el tamaño de los adipocitos, la liberación de ácidos grasos en el organismo, las citoquinas proinflamatorias, el reclutamiento de células

Introducción

inmunes, la hipoxia y la fibrosis mientras que disminuye la adiponectina y aumenta la resistencia a la insulina.

1.1.4. Adipogénesis y factores de transcripción

La adipogénesis es el proceso de formación de nuevos adipocitos, ésta se produce por la transformación o diferenciación de preadipocitos (células de morfología fibroblástica) a adipocitos maduros cargados de lípidos y con sensibilidad a la insulina. La adipogénesis consta de tres etapas principales: quiescencia, expansión y diferenciación reguladas por el receptor nuclear *PPAR γ* (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) y por la familia de factores transcripcionales *CEBPs* o *C/EBPs* (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) (10).

Al inicio de la adipogénesis, los preadipocitos salen del ciclo celular mediante procesos de inhibición por contacto. A continuación, se produce una expansión clonal previa a la activación transcripcional de los genes marcadores del adipocito y de la posterior adquisición del fenotipo adipocitario. La adipogénesis se puede describir como una cascada de eventos genéticos donde en la primera fase se incluyen las proteínas de unión *CEBP β* y *CEBP δ* las cuales a su vez son responsables del comienzo de la segunda fase. En esta primera fase, las células fibroblásticas van adquiriendo una estructura redondeada y los valores de los ARNm de marcadores adipogénicos aumentan. La segunda fase se corresponde con la activación de los factores de transcripción *PPAR γ* y *CEBP α* , los genes por excelencia del proceso de diferenciación. Su aparición se podría decir que activa la mayoría de los genes que dotarán a los aún preadipocitos del fenotipo adipocitario final, como pueden ser la enzima ácido graso sintasa (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC), el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), el receptor de insulina y la proteína de unión a ácidos grasos de tipo 4 (FABP4 también conocida como AP2). Como consecuencia se aprecia en el citoplasma de las células la aparición de gotas lipídicas,

Introducción

aumentando su tamaño y fusionándose con otras gotas a lo largo del tiempo dando lugar a una o dos grandes gotas que ocuparán gran parte del citoplasma. Se ha observado que *CEBPβ* es capaz de inducir la expresión de *CEBPα*, aún en ausencia de *PPARγ* y que *PPARγ* y *CEBPα* inducen también la expresión de sí mismos, así como también uno la del otro. Aunque *PPARγ* sería suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes que caracterizarán al adipocito futuro, se necesita *CEBPα* para dotar al adipocito de sensibilidad a la insulina (ver *Figura 3*) (11).

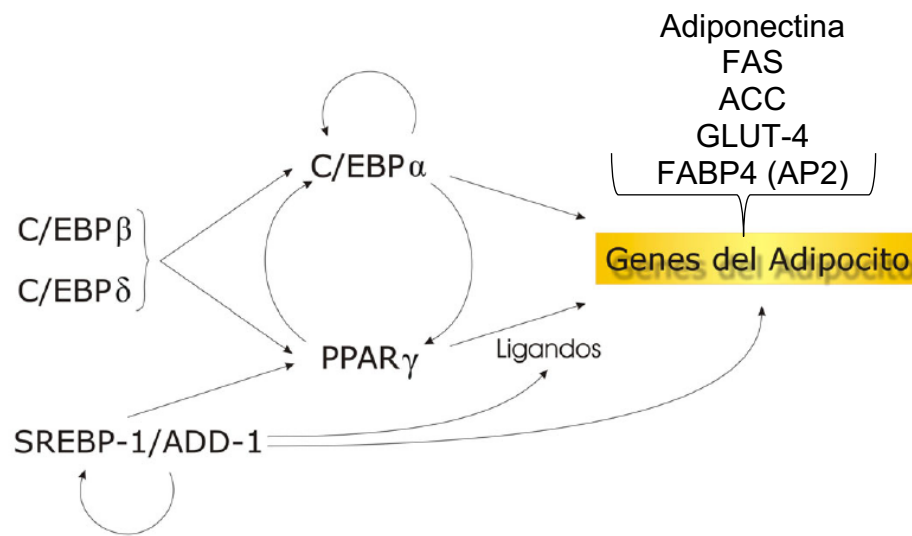


Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la cascada de acontecimientos que tienen lugar durante la adipogénesis. Tomada y modificada de (12).

1.2. microARNs (miARNs)

1.2.1. ¿Qué son?

Descubiertos en 1993 por Lee, Feinbaum y Ambros, los microARNs (miARNs) son una clase de pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) no codificantes, es decir que no se traducen a proteína, constituidos por aproximadamente 22 nucleótidos y que regulan la expresión génica uniéndose, fundamentalmente, a las regiones complementarias 3' no traducidas (3'UTRs) de los ARNm diana. Esta unión, en la mayoría de los

Introducción

casos, produce la degradación del ARNm e impide su traducción a proteínas (13).

1.2.2. Ruta de síntesis y degradación

La ruta general de síntesis de los miARNs se puede observar en la *Figura 4*.

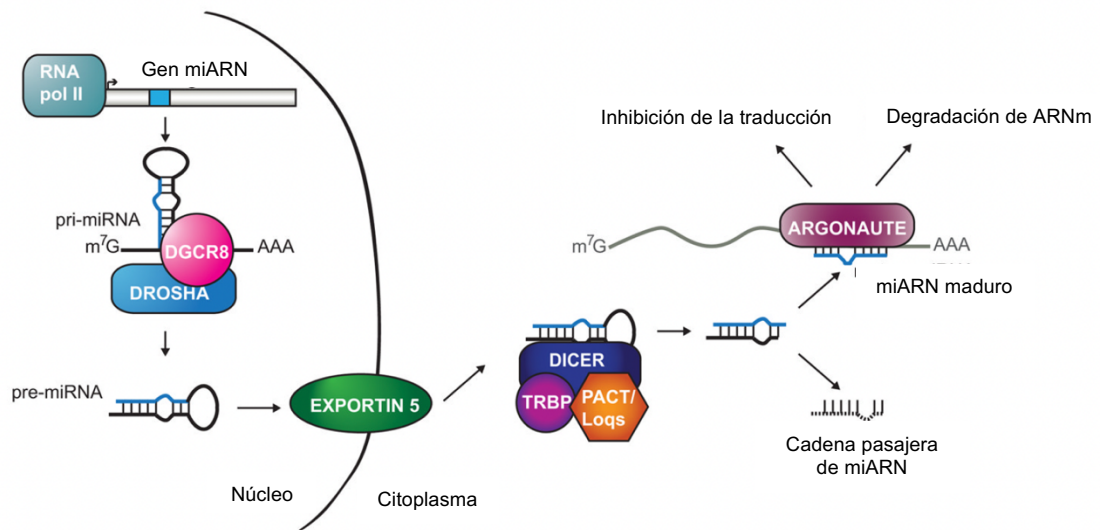


Figura 4. Ruta general de síntesis de los miARNs. Tomada y modificada de (14).

Inicialmente los miARNs se transcriben con la ARN Polimerasa II como precursores 5' poliadenilados y son conocidos como miARN primarios (pri-miARN). Después de la transcripción, este pri-miARN sufre un proceso de maduración gracias a la enzima Drosha que libera en el núcleo un pequeño ARN con forma de horquilla, llamado pre-miARN. El pre-miARN es transportado al citoplasma por la Exportina 5 y gracias a la ribonucleasa Dicer es procesado a miARN maduro. Se pueden generar dos miARNs maduros desde los extremos 3' y el 5' de un precursor pre-miARN. Solo una especie es viable en la mayor parte de los casos, mientras que las especies complementarias son degradadas (9).

Introducción

1.2.3. Implicación de los miARNs en la adipogénesis y en la obesidad

Aunque la mayoría de los miARNs se detectan en el microambiente celular, hay un número considerable de miARNs, comúnmente conocidos como miARNs circulantes o miARNs extracelulares (*ECmiARNs*) que se encuentran en el ambiente extracelular, incluidos diferentes fluidos biológicos (sangre, orina, lágrimas, leche materna) y medios de cultivo celular. Los miARNs maduros se pueden incorporar en exosomas, microvesículas o unirse a la proteína Argonauta 2 (Ago2), o a partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y liberarse al medio extracelular donde pueden viajar y llegar hasta células dianas en las que ejercer sus efectos, enfatizando su importancia como moléculas señalizadoras endocrinas y potenciales marcadores de enfermedades (9).

En la *Figura 5* se pueden observar los procesos de síntesis y liberación de los miARNs al ambiente extracelular (15).

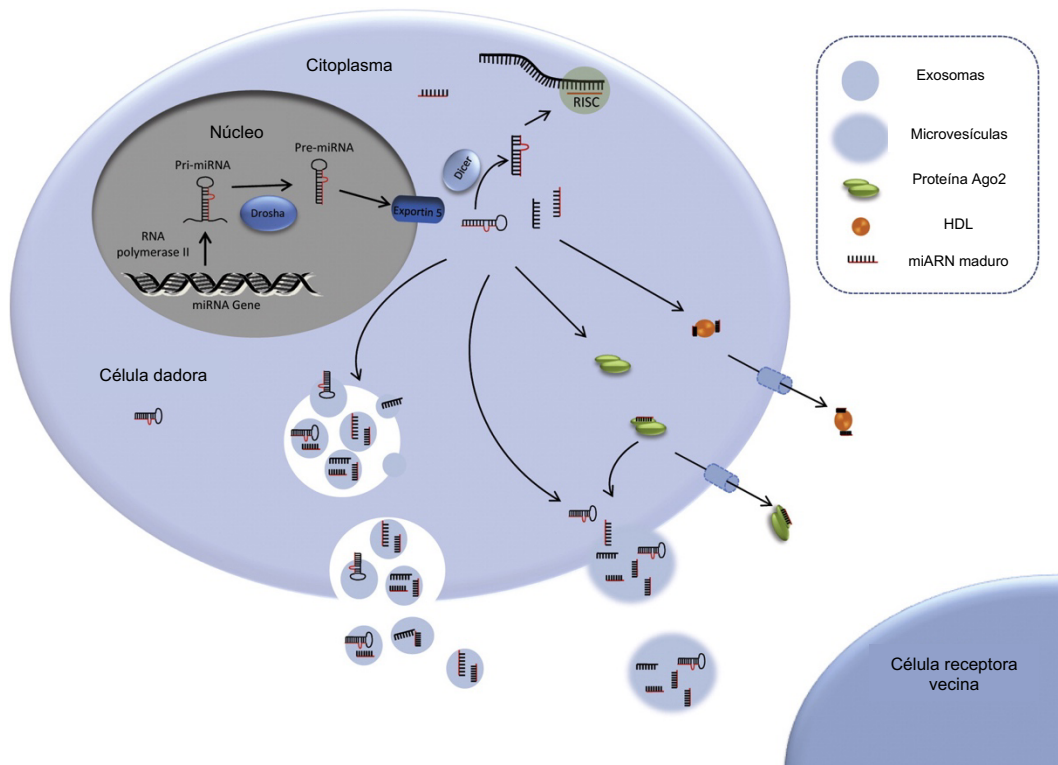


Figura 5. Síntesis y liberación de los miARNs al ambiente extracelular. Tomada y modificada de (15).

Introducción

En los últimos años, numerosos trabajos demostraron que distintos miARNs participan en la regulación de la homeostasis de carbohidratos y lípidos en humanos y otros organismos. Además, se observó que la desregulación de estos miARNs relacionados con el metabolismo, puede conducir al desarrollo de varios trastornos metabólicos, como la DM2, la obesidad, el hígado graso no alcohólico, la resistencia a la insulina o la hiperlipidemia (1) (13).

En la obesidad, numerosos trabajos han encontrado alteraciones en la expresión de diversos miARNs tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros. Se ha observado, por ejemplo, que la expresión de *miR-221*, *miR-125b*, *miR-34a* y *miR-100* está elevada en sujetos obesos, pero disminuye durante la adipogénesis, por el contrario, los valores de *miR-130b*, *miR-210* y *miR-185* están disminuidos en sujetos obesos y la expresión de *miR-130b* y *miR-210* disminuye durante la diferenciación a adipocitos en los depósitos de grasa subcutánea de sujetos obesos. *miR-34a* se ha encontrado elevado positivamente tanto durante la adipogénesis, como con el IMC. Se ha demostrado que durante la adipogénesis los miARNs pueden tanto estimular como inhibir la diferenciación de los adipocitos actuando sobre los factores de transcripción y regulando las rutas de señalización relacionados con ésta. Basak A *et al.* encontraron cinco miARNs en el tejido adiposo retroperitoneal donde *miR-143* estimula la diferenciación de adipocitos, *miR-103* y *miR-107* están relacionados con el metabolismo de lípidos (*miR-103* está elevado aproximadamente nueve veces durante la adipogénesis) y *miR-221* y *miR-222* están aumentados en adipocitos de pacientes obesos. *miR-103* y *miR-107* regulan genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos, mientras que *miR-221* y *miR-222* están relacionados con la expresión de adipocitoquinas. *miR-103* y *miR-143* están elevados durante la adipogénesis y disminuidos durante la obesidad. De hecho, ambos miARNs se expresan en grandes cantidades en los adipocitos. También se sabe que la expresión ectópica de *miR-103* o *miR-*

Introducción

143 en preadipocitos acelera la velocidad de la formación de las células grasas, cuya expresión se mide en presencia de varios marcadores de la adipogénesis elevados y con un aumento en la acumulación de triglicéridos en estadio temprano de la adipogénesis (16).

En la *Tabla III* se pueden observar algunos miARNs de los que se ha descrito su importancia metabólica en diferentes tejidos humanos, revisado por (13).

Tabla III. Algunos miARNs de importancia metabólica en diferentes tejidos. Tomada y modificada de (13).

Células β	Hígado	Músculo esquelético	Corazón	WAT	BAT
miR-375	miR-122	miR-1	miR-25	miR-365	miR-365
miR-200 family	miR-33a/b	miR-206	miR-199a-214	miR-193b	miR-193b
miR-7 family	miR-148a	miR-208b	miR-155	miR-126	miR-155
miR-335	miR-143	miR-133a/b		miR-92a	miR-133a/b
miR-152	miR-103/107	miR-499			miR-196a
miR-29 family	miR-802	miR-30b			miR-455
miR-181b	miR-181a	miR-143			
miR-184					
miR-187					
miR-204					
miR-17-92					
miR-129					
miR-34a					
miR-215					
miR-130a/b					

1.3. La familia *miR-200*

La familia *miR-200* está constituida por cinco miembros distintos: *miR-141*, *miR-200a*, *miR-200b*, *miR-200c* y *miR-429*. Tal como se puede ver en la *Figura 6*, se pueden agrupar en dos *clusters*, constituidos por distintos miembros de esta familia (17):

- **A:** Si atendemos a su localización cromosómica, el primer *cluster* estaría formado por *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-429*, todos localizados en el cromosoma 1, mientras que el segundo *cluster* estaría constituido por *miR-141* y *miR-200c* localizados en el cromosoma 12.

Introducción

- **B:** Si organizamos los *clusters* en función de su secuencia de nucleótidos, según tengan una citosina (C) o un uracilo (U) en la cuarta posición, el primer *cluster* lo formarían los miARNs *miR-141* y *miR-200a* (poseen una C en cuarto lugar) y el segundo los miARNs *miR-200b*, *miR-200c* y *miR-429* (todos ellos con un U en cuarto lugar).

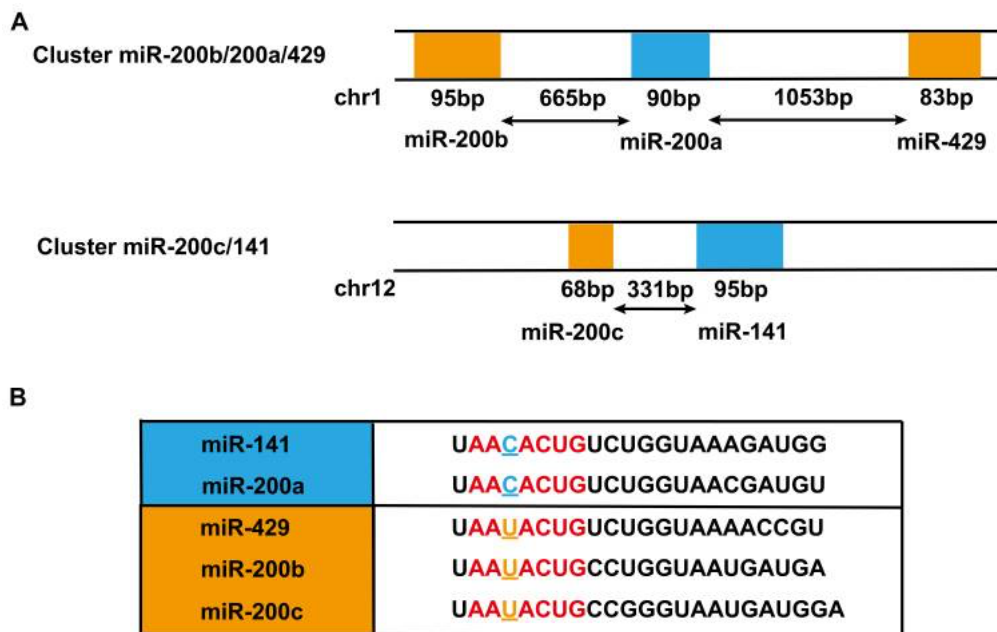


Figura 6. Dos maneras de diferenciar los clusters de la familia *miR-200* (17).

La clasificación seguida en el presente trabajo es la opción **B**.

Esta familia de miARNs ha sido ampliamente estudiada debido a su implicación en distintos procesos cancerígenos, se cree que la familia *miR-200* juega un papel esencial en la supresión de tumores al inhibir la transición epitelio-mesenquima (*EMT*) (17).

1.4. Línea celular 3T3-L1

La línea celular 3T3-L1 es una línea de preadipocitos derivada de células embrionarias de ratón, y un modelo ampliamente utilizado para estudiar el proceso de adipogénesis, puesto que bajo ciertos estímulos puede

Introducción

diferenciarse hacia adipocitos maduros. Tras la inducción de la adipogénesis, la morfología de estos adipocitos va cambiando a lo largo de todo el proceso de adipogénesis debido a la síntesis de triglicéridos y a la acumulación de lípidos. Después de 10-12 días se completa su diferenciación (18).

2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo se centraron en dos puntos principales:

1. Estudiar la implicación de la familia *miR-200* en la adipogénesis. Para ello se usaron células 3T3-L1 tratadas con factores lentivirales para sobreexpresar e inhibir distintos miembros de la familia *miR-200* y se procedió a su diferenciación.
2. Estudiar el efecto de la familia *miR-200* en la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis *de novo*. Para ello, al igual que antes, se usó la línea celular 3T3-L1 tratada con factores lentivirales para sobreexpresar e inhibir distintos miembros de la familia *miR-200* y se procedió a su diferenciación, tratamiento con insulina y estudio de proteínas clave de la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis *de novo*.

3. Material y métodos

3.1. Línea celular

Para llevar a cabo este trabajo de fin de máster, se utilizó la línea celular 3T3-L1, previamente tratada con factores lentivirales para sobreexpresar o inhibir distintos miembros de la familia *miR-200*. Ya que en el momento de generación de las distintas líneas estables no se disponía de un sobreexpresante y un inhibidor comercial que fuera único para toda la familia *miR-200*, se utilizaron dos factores lentivirales distintos. Uno de ellos con el fin de sobreexpresar simultáneamente *miR-141* y *miR-200c* mientras que el inhibidor utilizado afectaba directamente a *miR-200b*.

Puesto que la creación de las líneas estables 3T3-L1 que alterasen la expresión génica de distintos miembros de la familia *miR-200* no fue el objetivo de este trabajo de fin de máster, no se detallará el procedimiento empleado para ello. Simplemente se mostrarán los distintos plásmidos empleados para la generación de las mismas para favorecer la comprensión del trabajo aquí realizado. Los componentes de dichos plásmidos se pueden ver detallados en las *Figuras 7, 8, 9 y 10*. Concretamente, en la *Figura 7* se pueden observar los componentes del vector utilizado como control negativo en los estudios de sobreexpresión, en la *Figura 8* vemos la composición del vector lentiviral usado como control negativo en los estudios de inhibición, en la *Figura 9* se muestra el vector lentiviral utilizado para la generación de partículas lentivirales para sobreexpresar *miR-141* y *miR-200c* y en la *Figura 10* se muestra el vector lentiviral que se utilizó en la generación de células que presentan inhibida la expresión de *miR-200b*. Como se puede ver en las figuras mencionadas, todos los vectores poseen una proteína verde fluorescente (GFP), en este caso derivada de un copépodo (copGFP), que nos sirve para comprobar la integración de nuestros plásmidos en las células de interés. Además,

Material y métodos

también se llevaron a cabo análisis de la expresión génica de los miARNs de interés para comprobar efectivamente que sus valores se encontraban alterados (datos no mostrados).

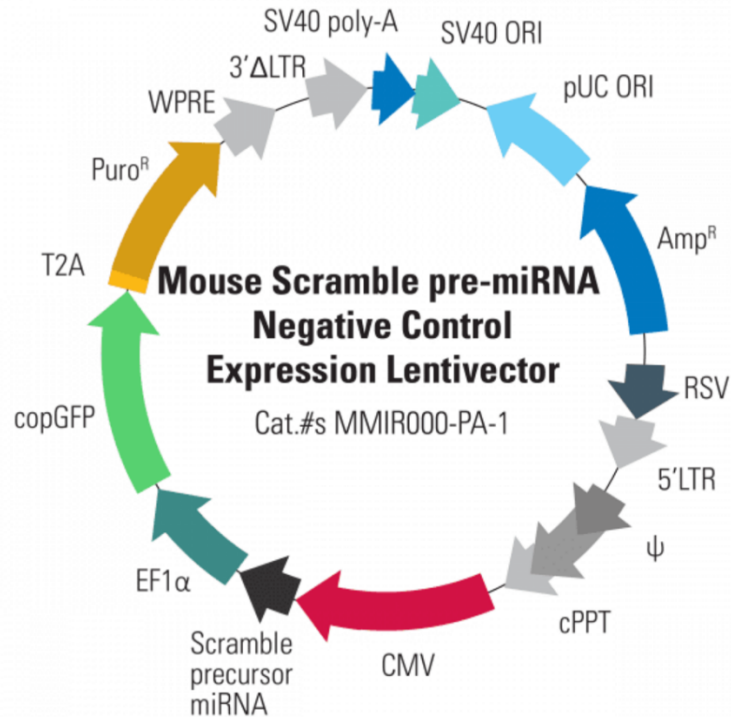


Figura 7. Vector lentiviral empleado como control en los estudios de sobreexpresión.

<https://systembio.com/shop/mouse-pre-mirna-scramble-negative-control-expression-lentivector/>

Material y métodos

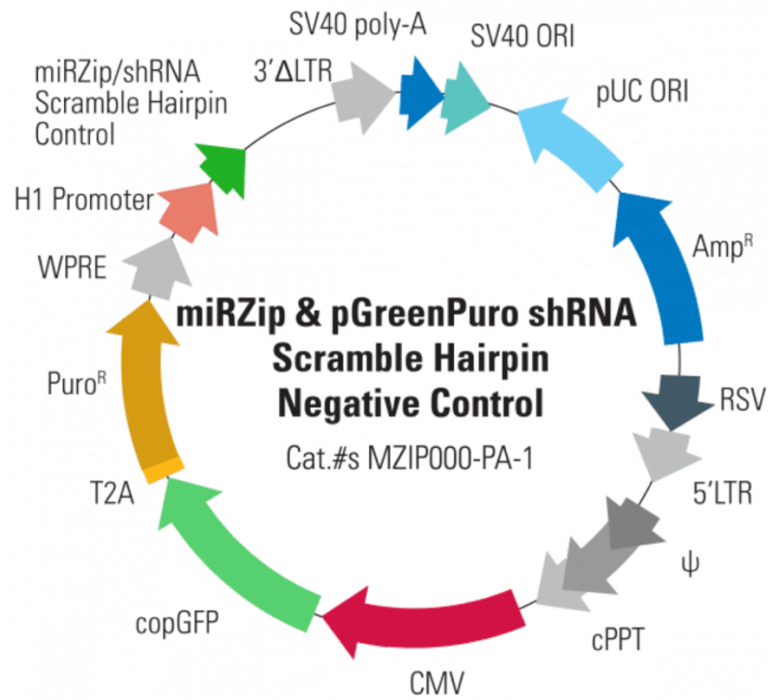


Figura 8. Vector lentiviral empleado como control en los estudios de inhibición. <https://systembio.com/shop/mirzip-shrna-scramble-hairpin-negative-control/>

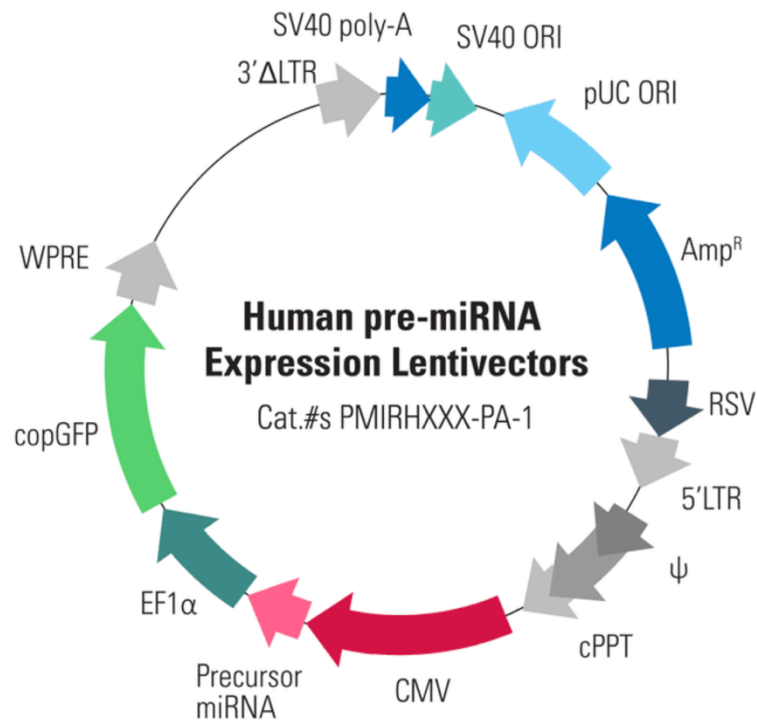


Figura 9. Vector lentiviral empleado para la creación de células 3T3-L1 que sobreexpresan miR-141 y miR-200c. <https://systembio.com/products/mirna-and-lncrna-research-tools/lenti-mir-precursor-vectors/lenti-mir-precursor-vectors/>

Material y métodos

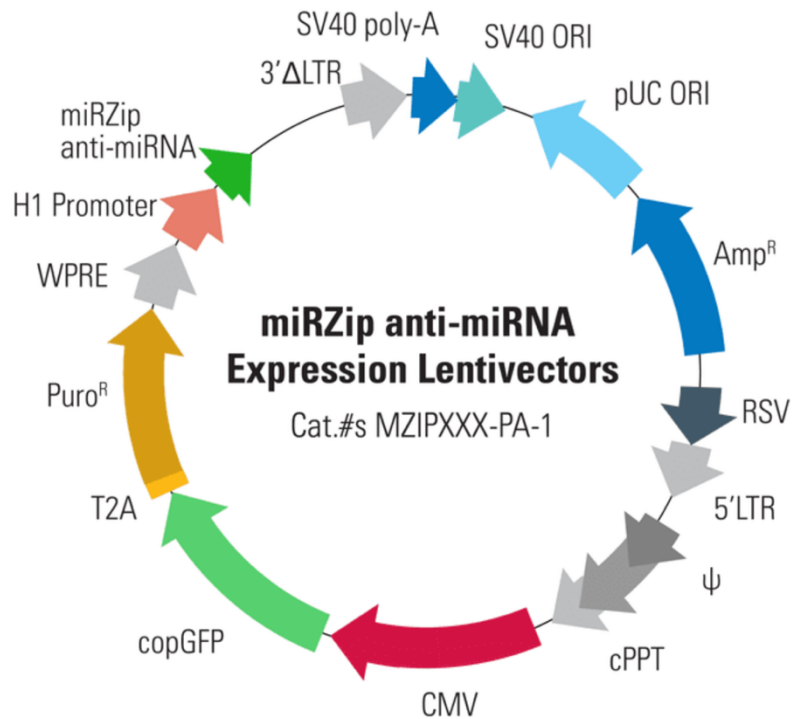


Figura 10. Vector lentiviral empleado para la creación de células 3T3-L1 con valores de miR-200b inhibidos. <https://systembio.com/products/mirna-and-lncrna-research-tools/mirzip-knockdown-vectors/mirzip-anti-mirna-constructs/>

3.2. Cultivos celulares

Las células 3T3-L1 ya transfectadas se sembraron en las placas de cultivo p100 con un medio de expansión/crecimiento formado por *DMEM* (Medio Dulbecco modificado) alto en glucosa + 10 % Calf Serum (alto en hierro) + 1 % penicilina/streptomicina (P/S, antibióticos).

Un ejemplo de las placas p100 en las que se realizaron los cultivos celulares se muestra en la *Figura 11*.

Material y métodos

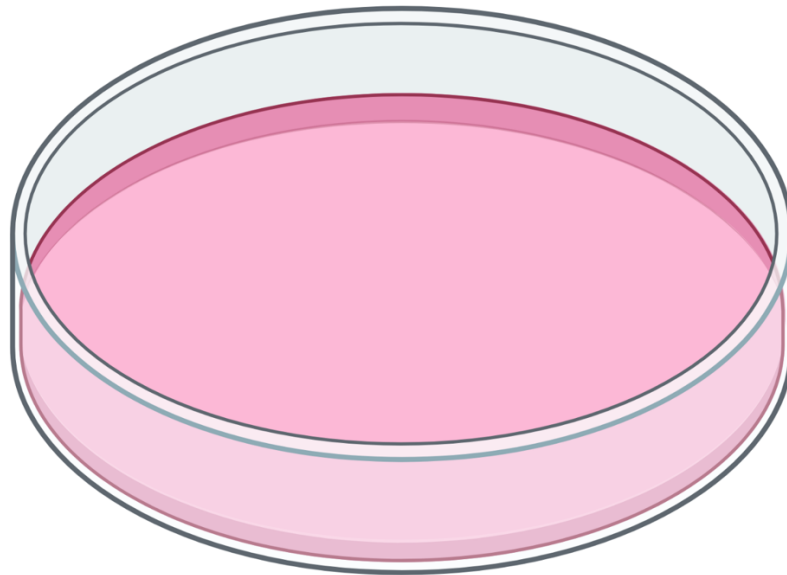


Figura 11. Ejemplo de una placa de cultivo p100. Realizada en <https://app.biorender.com/>

Cuando las células alcanzaron una confluencia entre el 75 % y el 80 % se expandieron a un número mayor de placas. Para realizar la expansión lo primero que se hizo fue lavar las células con suero salino y después se despegaron de la placa gracias al uso de tripsina, una vez despegadas la tripsina se neutralizó con medio con suero. Se recogieron las células, se centrifugaron y el precipitado (que contenía las células) se resuspendió en medio fresco. Las células se transfirieron a un número mayor de placas. Este proceso se repitió hasta alcanzar el número suficiente de células para llevar a cabo los experimentos planteados. En nuestro caso esto ocurrió en pase 17, y en ese momento las células se distribuyeron en placas de 12 pocillos (p12) (*Figura 12*). En estas placas se distribuyeron las distintas condiciones experimentales:

- Células control para el sobreexpresante de *miR-200* (CS)
- Células control para el inhibidor de *miR-200* (CI)
- Células que presentan valores sobreexpresados de *miR-141* y *miR-200c* (S200)
- Células que presentan *miR-200b* inhibido (I200)

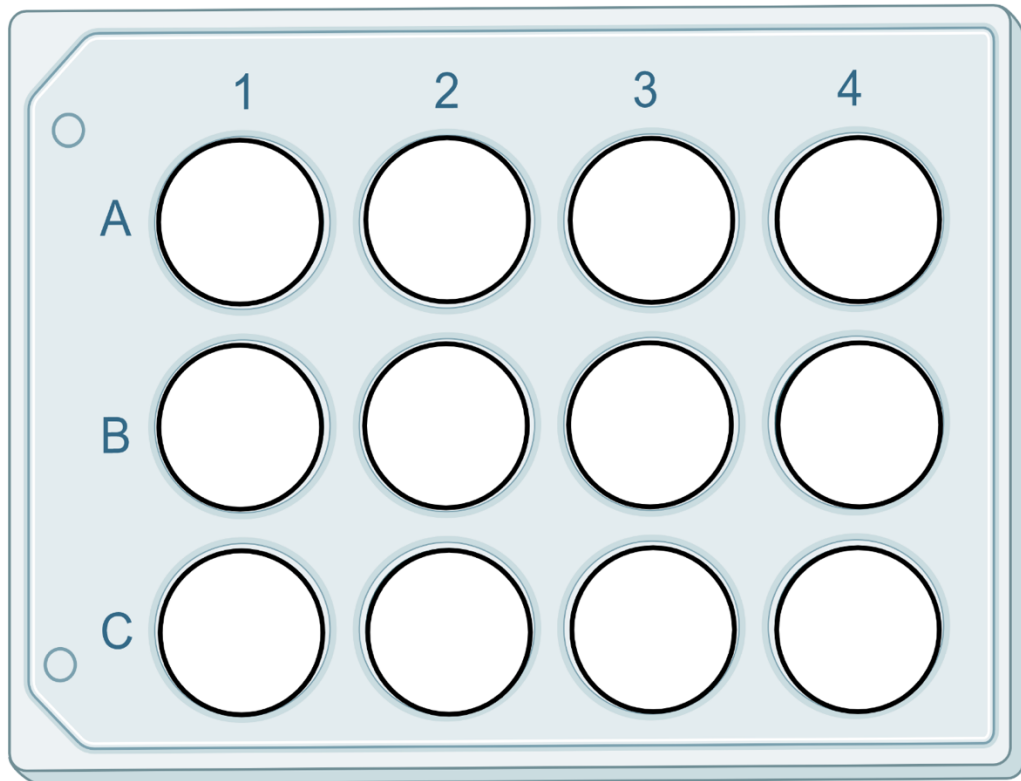


Figura 12. Ejemplo de una placa de cultivo de 12 pocillos (p12). Realizada en <https://app.biorender.com/>

Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 100 %, se esperó 48 horas antes de inducir el proceso de diferenciación, para asegurarse que todas las células están en fase de arresto (G0), condición indispensable para que se puedan diferenciar a adipocitos maduros. En la *Figura 13* se muestra una línea temporal del proceso de diferenciación de las células 3T3-L1, así como los medios de cultivo y tratamientos utilizados durante el proceso.

Material y métodos

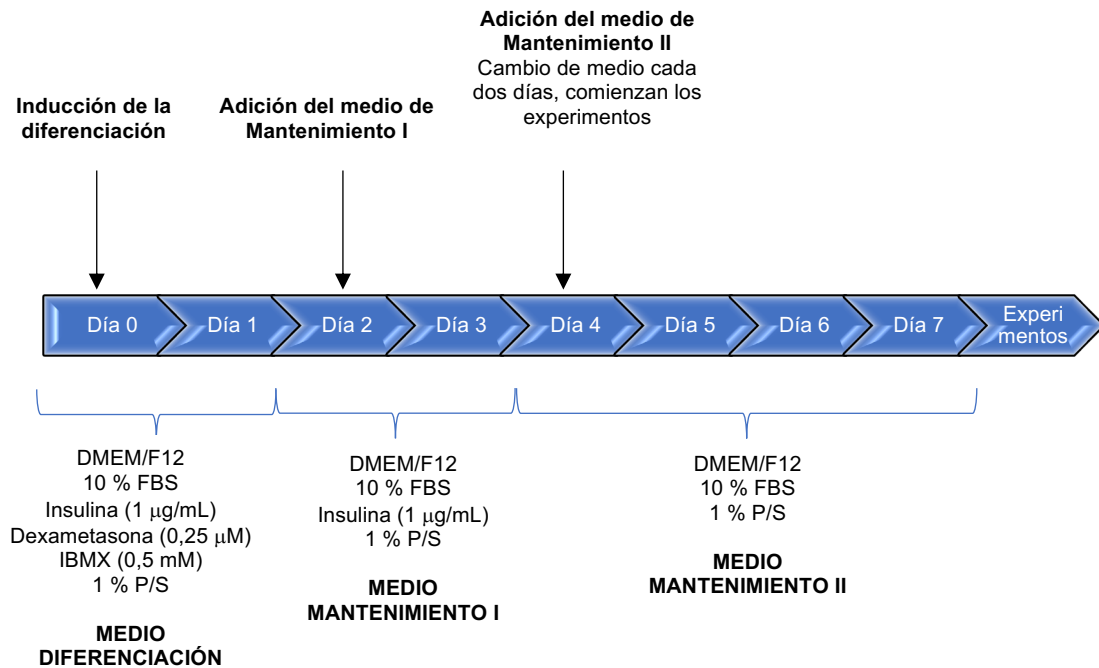


Figura 13. Línea temporal y medios de cultivo utilizados para la diferenciación de las células 3T3-L1.

1. Tal como se especifica en la *Figura 13*, dos días después de que las células alcancen la confluencia se elabora y se les adiciona medio de diferenciación. Este medio está compuesto por *DMEM/F12*, 10 % *FBS* (Suero bovino fetal), insulina (1 µg/mL), dexametasona (0,25 µM), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (0,5 mM) y 1 % P/S (antibióticos). A este día lo denominamos tiempo 0 de diferenciación ($t=0$).
2. Dos días después se prepara y adiciona a las células medio de mantenimiento I, que contiene *DMEM/F12*, 10 % *FBS*, insulina (1 µg/mL) y 1 % P/S. Las células se mantienen con este medio de cultivo durante otros dos días más.
3. A partir del día 4 a las células se les adiciona medio de mantenimiento II. Dicho medio está compuesto por *DMEM/F12*, 10 % *FBS* y 1 % P/S. Este medio se cambia cada dos días hasta llegar

Material y métodos

al día 7, momento en el que se “recogen/usan” las células para llevar a cabo los distintos análisis que se explicarán a continuación para poder dar respuesta a los objetivos planteados.

Experimento 1. Estudio de la adipogénesis tras la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c*

Para estudiar cómo afecta la sobreexpresión de la familia *miR-200* a la adipogénesis, se sembraron y se diferenciaron células 3T3-L1 transfectadas con factores lentivirales que sobreexpresan *miR-141* y *miR-200c* y con el control negativo de sobreexpresión. Se puede observar la distribución de las células sembradas en la placa de 12 pocillos en la *Figura 14*.

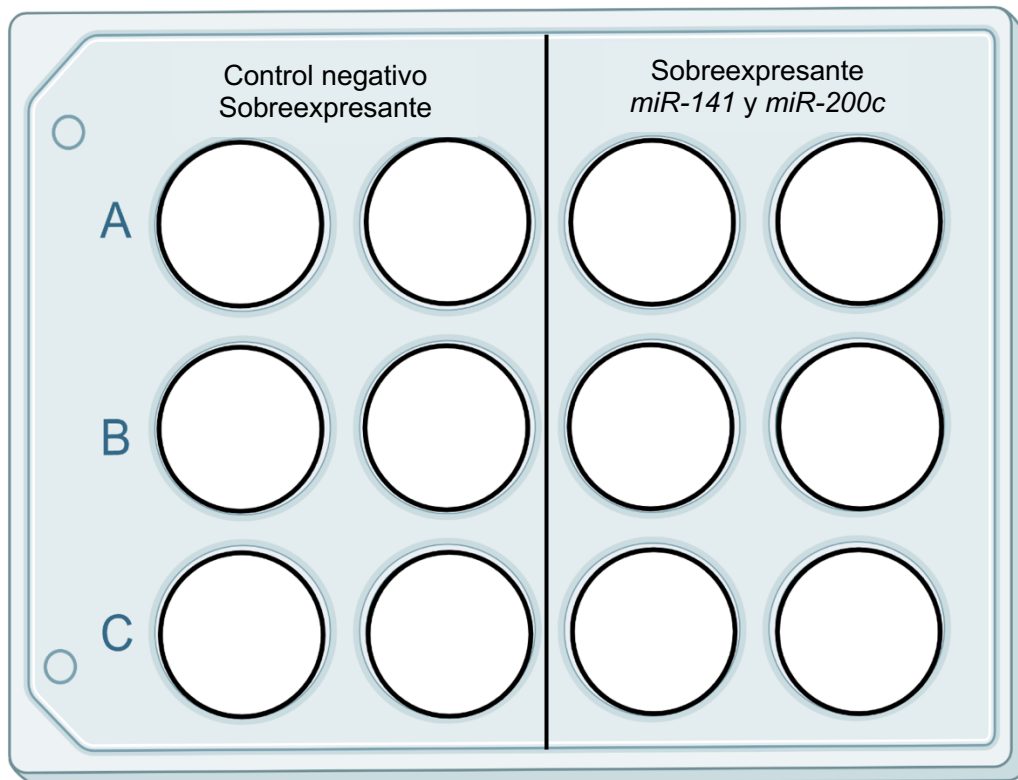


Figura 14. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que sobreexpresan *miR-141* y *miR-200c* en la placa p12. Realizada en <https://app.biorender.com/>

Material y métodos

Al séptimo día tras la inducción de la diferenciación, y para comprobar la diferenciación de las células se tomaron fotografías con un microscopio (Nikon Eclipse Ti) y además se procedió a realizar una tinción con Oil Red-O, que tiñe las gotas lipídicas. Para ello lo primero que se hizo fue lavar las células dos veces con tampón fosfato salino (*PBS*) frío, posteriormente se fijaron con formalina al 10 % durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente dos veces con *PBS*. Posteriormente se incubaron durante 1 min en 2-propanol (isopropanol) al 60 % y a continuación se añadió una solución de Oil Red-O y se incubaron las células durante 20-30 min a temperatura ambiente. Tras esta incubación se realizaron dos lavados con isopropanol al 60 % y otros dos con *PBS* y, por último, se observaron al microscopio y se sacaron fotografías con un microscopio (Nikon Eclipse Ts100) de los adipocitos ya teñidos. Una vez tomadas las fotografías se procede a la elución del Oil Red-O con isopropanol al 100 % y a su cuantificación en un lector de placas analizando su absorbancia (densidad óptica, *OD*) a 500 nm. En la *Tabla IV* se pueden observar las cantidades utilizadas de cada reactivo para la fijación y tinción de las células con Oil Red-O y su posterior elución.

Tabla IV. Cantidades utilizadas de los reactivos para la fijación, tinción y elución de las células con Oil Red-O.

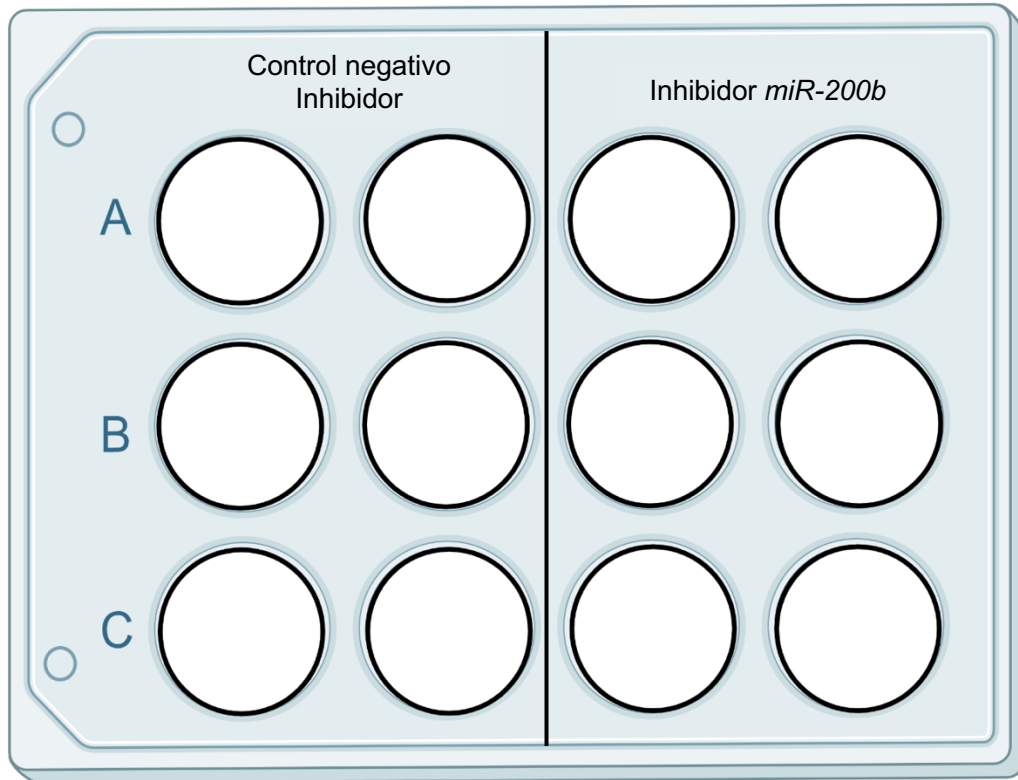
Placa	Formalina 10 %	Isopropanol 60 %	Oil Red-O	Isopropanol 100 %
12 pocillos	1 mL	1 mL	400 μ L	180 μ L

Experimento 2. Estudio de la adipogénesis tras la inhibición de *miR-200b*

Para estudiar cómo afecta la inhibición del miARN *miR-200b* a la adipogénesis, se sembraron y se diferenciaron las células transfectadas (de la manera anteriormente mencionada) con el control negativo de inhibición

Material y métodos

y las que presentan inhibido *miR-200b*. Se puede observar la distribución de las células sembradas en la placa de 12 pocillos en la *Figura 15*.



*Figura 15. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que inhiben *miR-200b* en la placa p12. Realizada en <https://app.biorender.com/>*

Se realiza la fijación de las células y la tinción con Oil Red-O exactamente de la misma manera que en el **Experimento 1**, utilizando los mismos procedimientos, reactivos y cantidades.

Experimento 3. Estudio de la sensibilidad a la insulina y la lipogénesis de novo tras la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c*

Para estudiar cómo afecta la sobreexpresión de la familia *miR-200* a la sensibilidad a la insulina, se sembraron y se diferenciaron las células transfectadas (de la manera anteriormente mencionada) con el control negativo de sobreexpresión y las que presentan sobreexpresados los

Material y métodos

miARNs *miR-141* y *miR-200c*, con y sin tratamiento de insulina agudo (100 nM durante 5 minutos). Se puede observar la distribución de las células sembradas en la placa de 12 pocillos en la *Figura 16*, siendo los pocillos en color blanco las células sin tratamiento de insulina agudo y los pocillos en color lila con tratamiento de insulina agudo durante 5 min antes de proceder a su “levantamiento”.

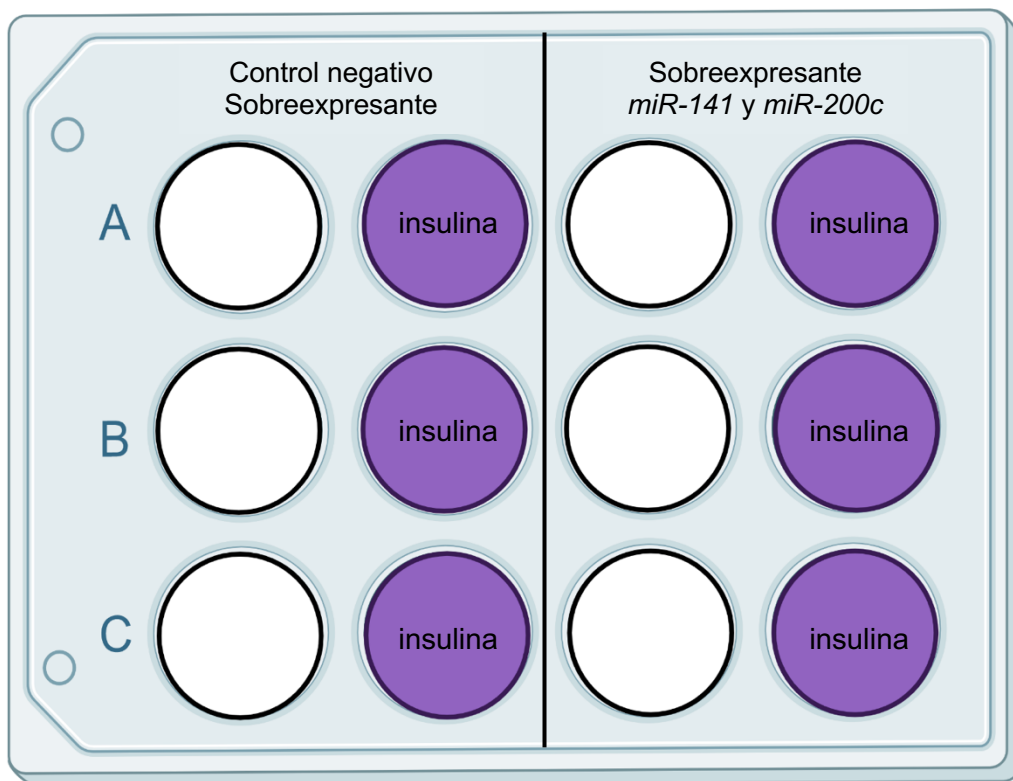


Figura 16. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que sobreexpresan *miR-141* y *miR-200c* con y sin insulina en la placa p12. Realizada en <https://app.biorender.com/>

Acto seguido se retiró el medio, las células se lavaron dos veces con *PBS* y se añadió un tampón de lisis (tampón RIPA) para poder extraer las proteínas, que se cuantificaron utilizando el reactivo de Bradford y se igualó la concentración de proteína en todas las muestras a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para su posterior congelación hasta el momento de realizar el *Western blot*. Se estudió, entre otras, la proteína AKT (proteína quinasa B). Esta proteína se

Material y métodos

encuentra activa de forma fosforilada, y pertenece a la ruta de señalización de la insulina, y es conocido que sus niveles de fosforilación disminuyen cuando aumenta la resistencia a la insulina. Para estudiar la lipogénesis *de novo* estudiaremos los niveles de expresión proteica de proteínas clave de esta ruta como: FAS, ACC y AMPK (proteína quinasa activada por Adenosín Monofosfato).

Experimento 4. Estudio de la sensibilidad a la insulina y la lipogénesis *de novo* tras la inhibición de *miR-200b*

Para estudiar cómo afecta la inhibición del miARN *miR-200b* a la sensibilidad a la insulina, se sembraron y se diferenciaron las células transfectadas (de la manera anteriormente mencionada) con el control negativo de inhibición y las que presentan inhibidas el miARN *miR-200b* con y sin tratamiento de insulina agudo (100 nM durante 5 minutos). Se puede observar la distribución de las células sembradas en la placa de 12 pocillos en la *Figura 17*, representando los pocillos en color blanco las células sin tratamiento de insulina agudo y los pocillos en color lila aquellos que recibieron un tratamiento de insulina agudo durante 5 min.

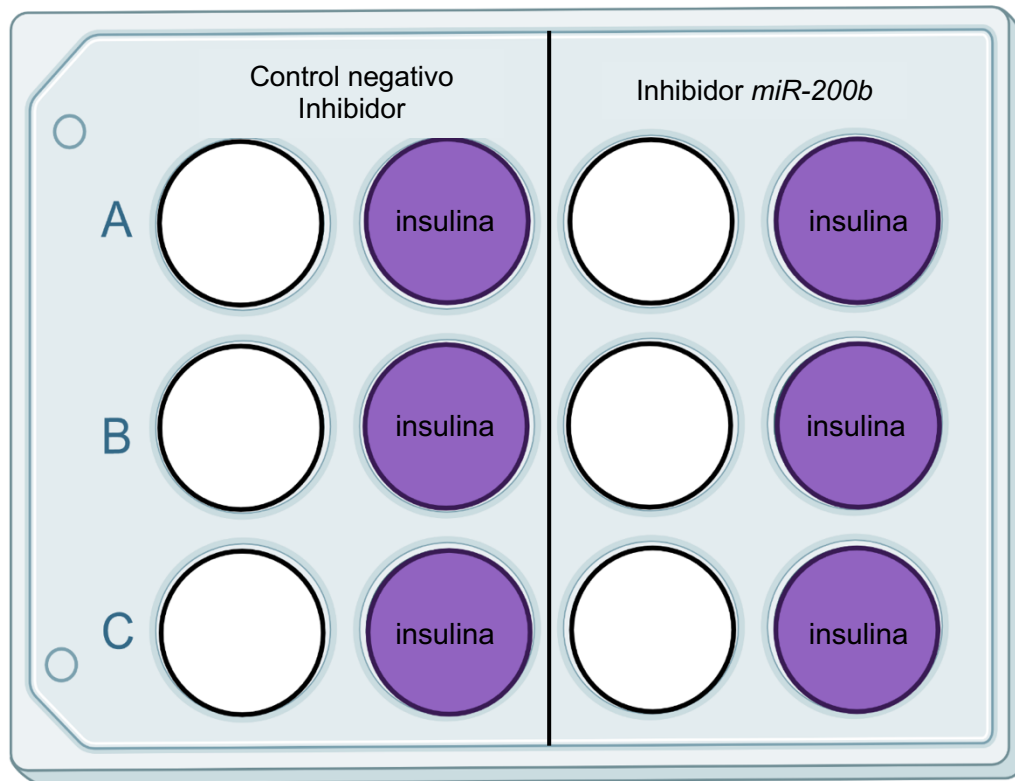


Figura 17. Distribución de células transfectadas con factores lentivirales control y que inhiben *miR-200b* con y sin insulina en la placa p12. Realizada en <https://app.biorender.com/>

Acto seguido se retiró el medio, las células se lavaron dos veces con *PBS* y se añadió un tampón de lisis (tampón RIPA) para poder extraer las proteínas, que se cuantificaron utilizando el reactivo de Bradford y, al igual que se explicó previamente, se igualó la concentración de proteína en todas las muestras a $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para su posterior congelación hasta el momento de realizar los *Western blots* y analizar las mismas proteínas detalladas en el experimento anterior.

3.3. *Western blot (WB)*

Para cuantificar la expresión de diversas proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos y la ruta de señalización de la insulina utilizamos la técnica *Western blot* siguiendo protocolos previamente establecidos y que se explicarán a continuación.

Material y métodos

3.3.1. Extracción de proteínas

Para llevar a cabo el análisis de expresión proteica el primer paso fue realizar la extracción de proteínas, proceso que se lleva a cabo en frío para evitar su degradación. Para ello, a los distintos pocillos se añade tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl (pH=7,5), Triton 1 % v/v, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 5 mM Na₄P₇O₂, 0,5 M sacarosa, cóctel inhibidor de proteasas, β-mercaptoetanol 0,1 % v/v), se despegan las células con la ayuda de una espátula y se recogen para un microtubo estéril. Posteriormente, para facilitar el proceso de extracción de proteínas, las distintas muestras se homogenizan en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos y posteriormente con el uso de un vórtex. Una vez extraídas las proteínas, se centrifugan durante 15 min a 4 °C y 14000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se cuantifica la concentración de proteínas.

3.3.2. Cuantificación de proteínas

Una vez obtenidas las proteínas, y antes de proceder a la técnica de *Western blot*, se procede a su cuantificación. Para ello, se utiliza el método/reactivo de Bradford que es una técnica colorimétrica que emplea como colorante el azul de Coomassie G-250. Para calcular la concentración de proteínas se usa una curva patrón con concentraciones conocidas de la proteína seroalbúmina bovina (*BSA*). Para cada muestra se prepararon alícuotas con una concentración de 2 µg proteína/µL y se les añadió un tampón de carga constituido por: 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), SDS 5 % p/v, glicerol 10 % p/v, β-mercaptoetanol 5 % v/v y azul de bromofenol 0,0025 % p/v. El proceso de extracción, cuantificación y preparación de las proteínas se llevó a cabo en el mismo día y una vez realizado se guardaron las muestras a -80 °C hasta su uso.

3.3.3. Electroforesis *SDS-PAGE*

La separación por peso de las diferentes proteínas presentes en cada muestra se lleva a cabo por electroforesis en geles *SDS-PAGE* (Electroforesis en gel de poliacrilamida-Sulfato de Sodio Dodecílico). Estos geles se componen a su vez de dos partes:

- Concentrador: gel que se coloca en la parte superior cuya función es la de concentrar y homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador.
- Separador: gel que se coloca en la parte inferior cuya función es la de separar las distintas proteínas en función de su peso. Estos geles se pueden preparar con distintos porcentajes de acrilamida según los pesos de las proteínas que se deseen estudiar, siendo su relación inversamente proporcional, por lo que cuanto mayor sea el peso de la proteína, menor deberá ser el porcentaje de acrilamida de los geles.

Para el presente trabajo el gel separador se prepara a una concentración del 7 % de acrilamida. En la *Tabla V* se pueden observar los distintos reactivos necesarios para la preparación de ambos geles.

Material y métodos

Tabla V. Reactivos necesarios para la preparación de los geles.

	Concentrador 7 % acrilamida	Separador 7 % acrilamida
Agua destilada	4,28 mL	5,18 mL
Buffer A	---	11,48 mL
Buffer B	6 mL	---
Acrilamida	1,58 mL	5,36 mL
APS	60 μ L	127,5 μ L
Temed	30 μ L	63,76 μ L

APS: Persulfato de amonio

Buffer A: 0,75 M Tris-Base (pH=8,8) y 0,2 % de SDS.

Buffer B: 0,2 M Tris-HCl (pH=6,8) y 0,2 % de SDS.

Para llevar a cabo la electroforesis se cargaron 18 μ L de cada muestra por pocillo, para así tener una concentración final de 36 μ g de proteína en cada pocillo del gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a un voltaje constante de 130 V.

3.3.4. Transferencia

Una vez que la electroforesis finalizó, las proteínas se transfieren del gel de acrilamida a una membrana de *PVDF* (*Polyvinylidene Fluoride*, Milipore) utilizando un dispositivo de transferencia en semiseco (Trans-blot, Bio-Rad). Para ello previamente la membrana de *PVDF* se activa 2 min en metanol y posteriormente se lava durante 5 min en agua destilada y finalmente se sumerge 10 min en tampón de transferencia que está compuesto por Tris-Base, glicina y SDS. La membrana se coloca en el aparato de transferencia, se coloca encima el gel de acrilamida y el proceso de transferencia se lleva a cabo durante 1 h y 40 min a un amperaje

Material y métodos

constante de 180 mA. Al finalizar la transferencia, la membrana se bloquea con *BSA* al 3 % durante 1 h.

3.3.5. Incubación e inmunodetección

Tras el proceso de bloqueo se procede a incubar la membrana con anticuerpos específicos contra nuestras proteínas de interés (anticuerpos primarios) y se dejan incubando las membranas toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se retiran los anticuerpos primarios y se realizan al menos 5 lavados a las membranas con *TBS-Tween* al 0,1 % durante un total de 45 min para asegurar que los restos de los anticuerpos primarios han sido retirados por completo. Finalizados los lavados se incuban las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 2 h. Se realizan de nuevo al menos 5 lavados a las membranas con *TBS-Tween* al 0,1 % durante un total de 45 min para asegurar que los restos de los anticuerpos secundarios han sido retirados por completo.

La detección de la señal de las diferentes proteínas se realiza mediante quimioluminiscencia utilizando una cámara CCD (Fujifilm Intelligent Dark Box LAS-3000) y el reactivo *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific™). La cuantificación de la expresión proteica se llevó a cabo utilizando el programa informático *ImageJ* (19).

Los diferentes anticuerpos utilizados, así como sus concentraciones, se muestran en la *Tabla VI*.

Material y métodos

Tabla VI. Anticuerpos primarios y secundarios usados y sus diluciones.

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Dilución	Casa comercial
FAS	1/1000	Santa Cruz	Anti-rabbit	1/5000	Dako Cytomation
pAKT	1/1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1/5000	Dako Cytomation
pAMPK	1/1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1/5000	Dako Cytomation
pACC	1/1000	Millipore	Anti-rabbit	1/5000	Dako Cytomation
β -actina	1/1000	Sigma Aldrich	Anti-mouse	1/7000	Dako Cytomation

3.3.6. Análisis estadístico

Para estudiar la significación estadística entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Para determinar la significación estadística entre dos grupos con dos tratamientos se utilizó ANOVA de dos vías con pruebas *post hoc* Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa *SigmaPlot*®, versión 11 (Systat Software). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las gráficas se realizaron con Microsoft Excel.

4. Resultados y discusión

Los miARNs son una clase de ARN no codificantes altamente conservados a lo largo de la evolución que degradan el ARNm o inhiben su traducción, regulando más del 60 % de los genes codificadores de proteínas humanas como una especie de regulador postranscripcional. Un solo miARN puede regular cientos de dianas diferentes, mientras que un solo ARNm también puede ser regulado por múltiples miARNs diferentes. Hasta el momento, diferentes estudios han demostrado que los miARNs participan en procesos biológicos fundamentales incluido el desarrollo embrionario temprano, la proliferación celular, la apoptosis, la muerte celular, el metabolismo energético e incluso regulan la diferenciación de las células madre (20) (21).

Como ya se ha comentado, la familia de miARNs *miR-200* consta de cinco miembros, que forman dos grupos ubicados en dos regiones genómicas diferentes (17). Es una de las familias de miARNs cuya expresión se ve alterada en el cáncer más frecuentemente. La regulación de la expresión de la familia *miR-200* está asociada con: supresión de la transición epitelio-mesenquima y metástasis tumoral a través del eje *miR-200/ZEB1-2*, inhibición de la autorrenovación y diferenciación de células madre cancerosas y reversión de quimiorresistencia (22).

Diversos estudios han señalado la implicación de distintos miembros de la familia *miR-200* con la resistencia a la insulina y el metabolismo, así por ejemplo, se ha visto que la reducción de *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-200c* en hepatocitos contribuye a la resistencia a la insulina y la expresión hepática de estos miARNs en ratones db/db se reduce en respuesta a la resistencia a la insulina (23). También se ha observado que la expresión reducida de *miR-200b* y *miR-200c* contribuye a la acumulación anormal de lípidos hepáticos (24). En ratones, la ablación adipocitaria de *miR-200a*,

miR-200b y *miR-429* provoca obesidad cuando se alimentan con dieta alta en grasa (25).

A pesar de todo esto, el papel de esta familia de miARNs en la adipogénesis es en gran medida desconocido, es por ello que, en este trabajo de fin de máster, se estudió la influencia de varios de los miembros de la familia *miR-200* en la adipogénesis, la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis *de novo*.

4.1. Experimento 1. Resultado de la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* en la adipogénesis

Con el fin de estudiar la implicación de la familia *miR-200* en la adipogénesis, el primer experimento planteado fue inducir el proceso de adipogénesis en la línea celular 3T3-L1 transfectada previamente con lentivirus para inducir la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* simultáneamente. Siete días después de inducir la adipogénesis se tomaron fotografías y se cuantificó la cantidad de triglicéridos presentes mediante la tinción y elución de Oil Red-O en las células control y en aquellas que presentan valores de expresión de *miR-141* y *miR-200c* aumentados.

En la *Figura 18* se pueden observar células 3T3-L1 siete días después de inducir la adipogénesis. En la *Figura 18A* se muestran las células control mientras que en la *Figura 18B* se pueden ver células con valores sobreexpresados de *miR-141* y *miR-200c*. Como se puede observar, la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* inhibe la adipogénesis, puesto que se puede ver claramente que hay muchos menos adipocitos maduros, que son aquellos con aspecto redondeado y que acumulan gotas lipídicas en su citoplasma (a modo de ejemplo se han señalado varios de ellos con flechas rojas). Estos datos preliminares parecen indicar que la sobreexpresión de miARNs pertenecientes a la familia de *miR-200* inhibe la adipogénesis.

Resultados y discusión

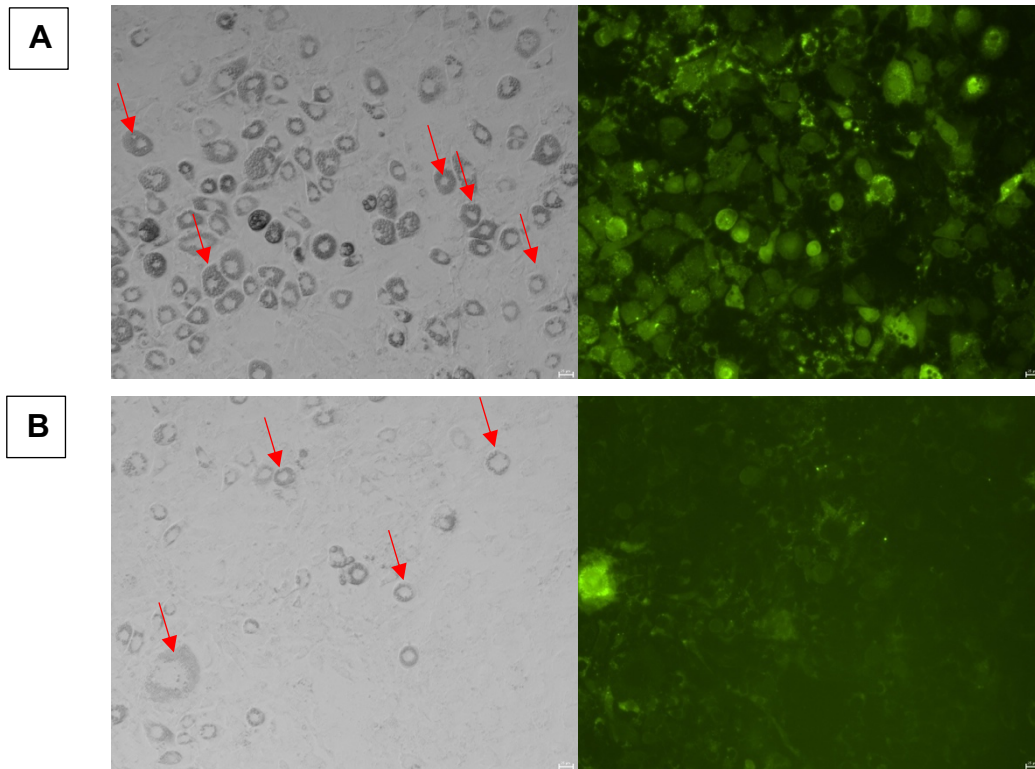
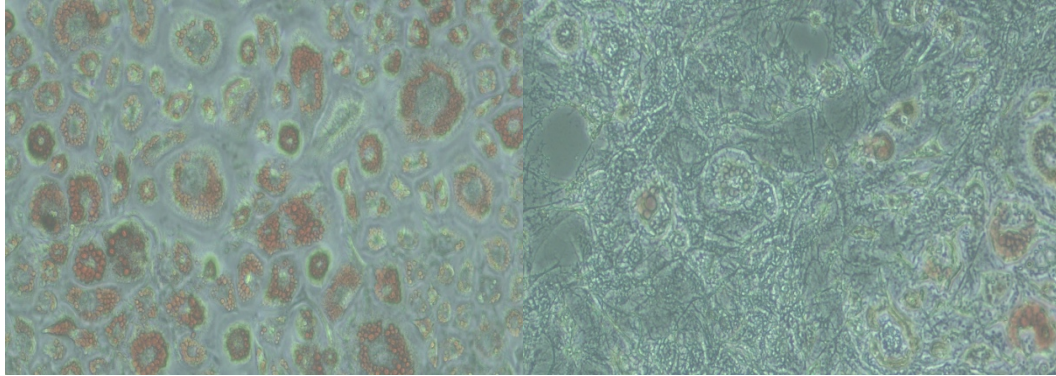


Figura 18. Fotografías de células 3T3-L1 control (A) y con sobreexpresión de miR-141 y miR-200c (B) 7 días después de inducir la adipogénesis. También se muestran sus correspondientes fotografías de fluorescencia todas ellas a un aumento de 10X. La barra de escala representa 25 μm . Las flechas rojas señalan adipocitos maduros.

Para corroborar los resultados anteriores se realizó una tinción Oil Red-O, cuyos resultados se pueden observar en la *Figura 19*. Aquí se puede observar que la tinción Oil Red-O en aquellas células que sobreexpresan miR-141 y miR-200c (*Figura 19B*) es menor que en las células control (*Figura 19A*).

A



B

Figura 19. Fotografías de las células 3T3-L1 con tinción Oil Red-O control (A) y con sobreexpresión de miR-141 y miR-200c (B) 7 días después de inducir la adipogénesis a un aumento de 10X. La barra de escala representa 25 μ m.

A continuación, se eluyó el Oil Red-O de las células y se analizó su absorbancia, para poder cuantificar de este modo la cantidad de triglicéridos que hay en ambos grupos celulares. Los resultados se muestran en la *Figura 20*, donde se puede observar que la absorbancia es más del triple en las células control en comparación a aquellas que presentan valores sobreexpresados de *miR-141* y *miR-200c*.

Resultados y discusión

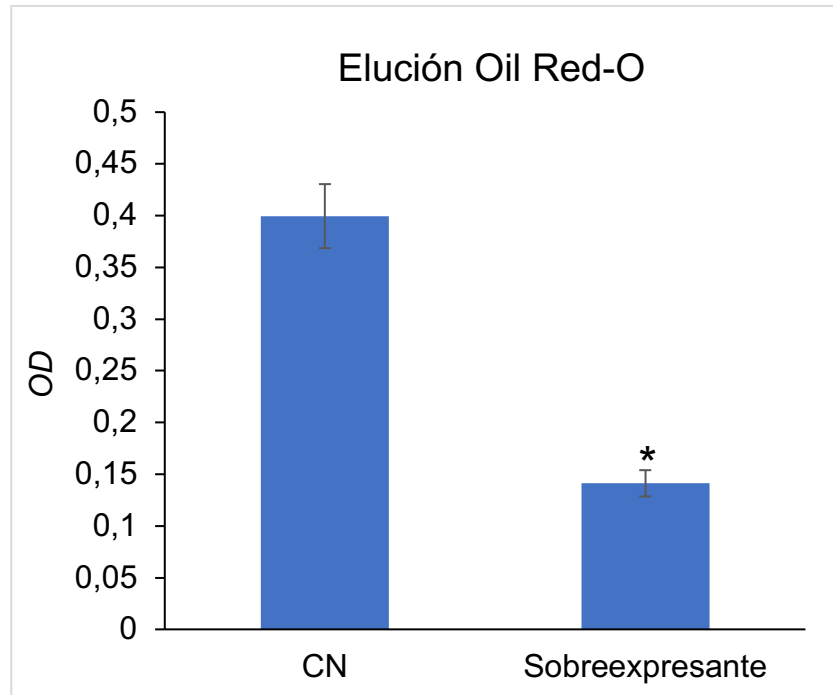


Figura 20. Niveles de absorbancia, (OD) del Oil Red-O extraído de los dos grupos de células representadas en la Figura 19. CN: Células control. Sobreexpresante: células que sobreexpresan miR-141 y miR-200c. Las barras representan medias \pm desviación estándar de la media N=6. * $P < 0,05$ (t-Student).

Los resultados mostrados en las Figuras 19 y 20 coinciden con lo anteriormente sugerido y es que la sobreexpresión de miembros de la familia de *miR-200* inhibe la adipogénesis.

4.2. Experimento 2. Resultado de la inhibición de *miR-200b* en la adipogénesis

Para este experimento se realizó el cultivo celular y la diferenciación de las células de la misma manera que en el **Experimento 1**, pero en este caso se sembraron células control y células con *miR-200b* inhibido. Siete días después de inducir la adipogénesis, se llevaron a cabo los distintos análisis.

En la Figura 21 se pueden observar células 3T3-L1 siete días después de inducir la adipogénesis. En la Figura 21A se pueden ver células control

Resultados y discusión

mientras que en la *Figura 21B* se pueden ver células tratadas con lentivirus para inhibir *miR-200b*. Como se puede observar, la inhibición de *miR-200b*, al contrario de lo que sucedía con la sobreexpresión de miARNs de la misma familia, estimula la adipogénesis, puesto que se puede ver claramente que hay muchos más adipocitos maduros. Estos datos preliminares parecen indicar que la inhibición de este miARN estimula la adipogénesis.

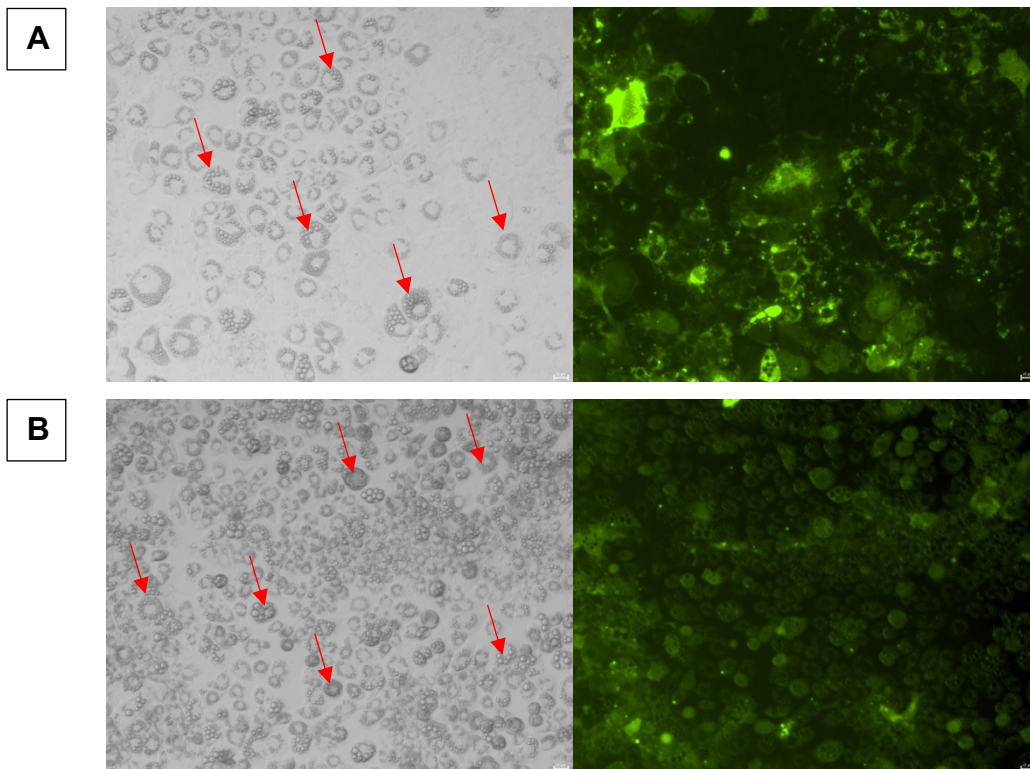


Figura 21. Fotografías de células 3T3-L1 control (A) y con inhibición de miR-200b (B) 7 días después de inducir la adipogénesis. También se muestran sus correspondientes fotografías de fluorescencia todas ellas a un aumento de 10X. La barra de escala representa 25 μ m. Las flechas rojas señalan adipocitos maduros.

De manera contraria a lo que sucedió con la sobreexpresión de distintos miembros de la familia *miR-200*, la inhibición de *miR-200b* aumenta la formación de adipocitos maduros favoreciendo por lo tanto la adipogénesis. Estos resultados, sumados a los obtenidos en el apartado anterior, parecen indicar que la familia *miR-200* está implicada en la formación de adipocitos maduros. Mientras que valores altos de varios miembros de esta familia

Resultados y discusión

provocan la inhibición de la adipogénesis, una inhibición de *miR-200b* provoca una estimulación de la misma.

Para corroborar los resultados mostrados en la *Figura 21*, se realizó una tinción Oil Red-O y su posterior elución, cuyos resultados se pueden observar en las *Figuras 22* y *23*.

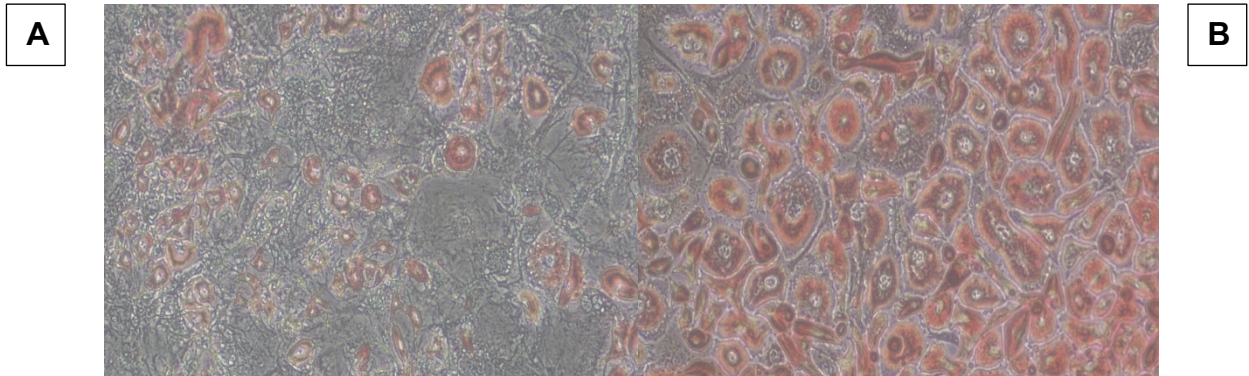


Figura 22. Fotografías de las células 3T3-L1 con tinción Oil Red-O control (A) y con inhibición de miR-200b (B) 7 días después de inducir la adipogénesis a un aumento de 10X. La barra de escala representa 25 μ m.

En la *Figura 22* se puede observar que la tinción Oil Red-O en las células con *miR-200b* inhibido es mayor que en las células control. La cuantificación de la elución de la tinción Oil Red-O y, por tanto, de la cantidad de triglicéridos presentes, tanto en células control, como en células con *miR-200b* inhibido, se muestra en la *Figura 23*, donde se puede observar claramente que la inhibición de *miR-200b* favorece la deposición de triglicéridos.

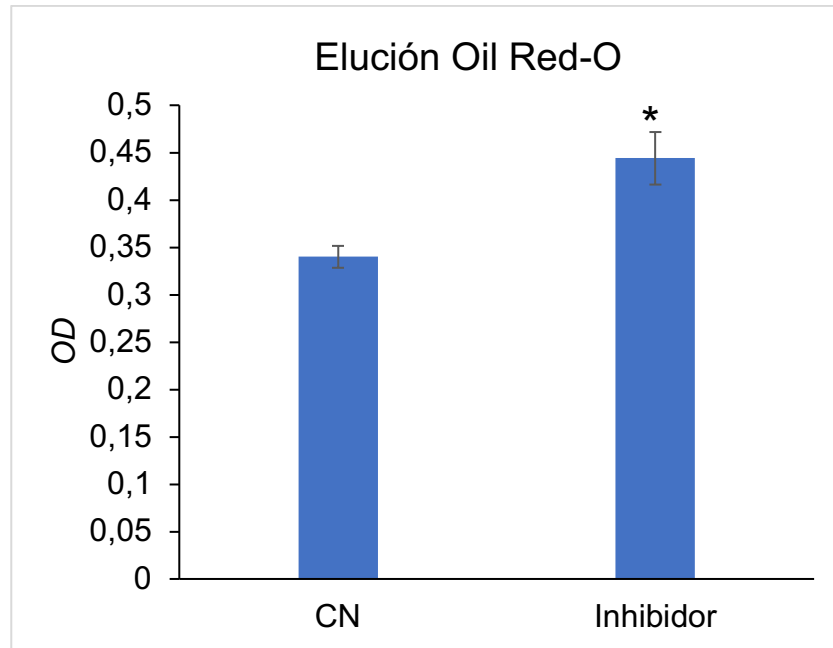


Figura 23. Niveles de absorbancia, (OD) del Oil Red-O extraído de los dos grupos de células representadas en la Figura 22. CN: Células control. Inhibidor: células que inhiben miR-200b. Las barras representan medias \pm desviación estándar de la media N=6. * $P < 0,05$ (t-Student).

4.3. Experimento 3. Resultado de la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* en la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis *de novo*

Para llevar a cabo este experimento se realizó el cultivo celular y la diferenciación de las células del mismo modo que en los experimentos previos. Adicionalmente, parte de las células se trataron con insulina de modo agudo tal como se ha descrito en el apartado de metodología. Posteriormente se realizó la cuantificación de la expresión de proteínas implicadas en la lipogénesis (FAS, pACC y pAMPK) y en la ruta de señalización de la insulina (pAKT) utilizando la técnica *Western blot* y usando la proteína β -actina como control de carga. Los resultados obtenidos se pueden observar en las Figuras 24 y 25.

Resultados y discusión

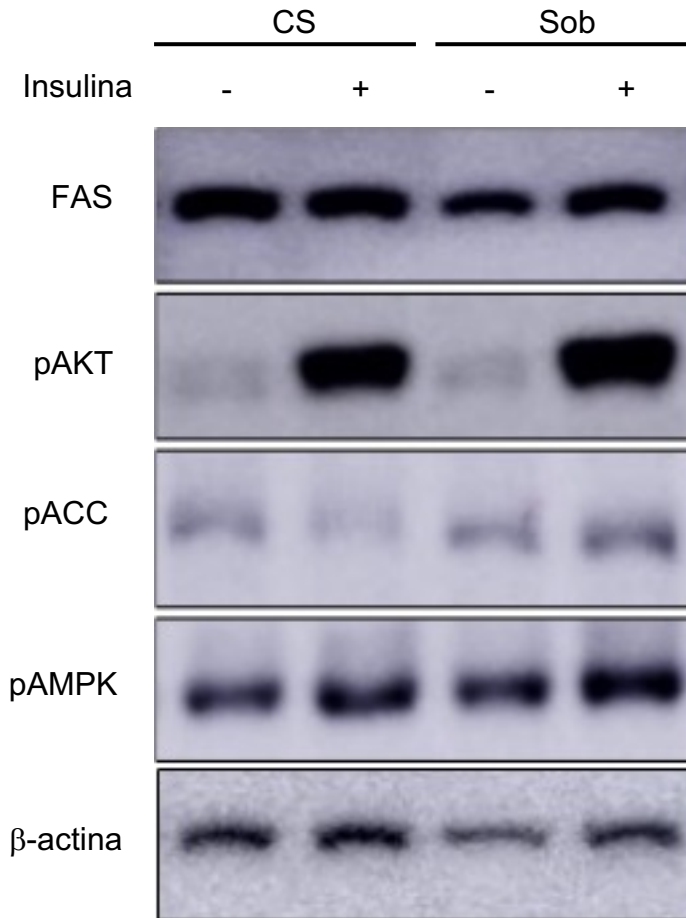


Figura 24. Western blot representativo de las proteínas FAS, pAKT, pACC, pAMPK y β -actina en células 3T3-L1 control y con los miARNs miR-141 y miR-200c sobreexpresados con y sin tratamiento con insulina (100 nM durante 5 minutos).

El metabolismo de los nutrientes es fundamental para el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de todos los organismos y requiere de una regulación coordinada de muchas rutas metabólicas. La insulina regula el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas a través de la cascada de señalización de la insulina, que involucra al receptor de insulina (*IR*), las proteínas del sustrato del receptor de insulina (*IRS*), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y AKT. La unión de la insulina a su receptor provoca la activación de AKT mediante su fosforilación, induciendo, entre otras cosas, que se produzca la estimulación de la lipogénesis *de novo*. Cuando existe resistencia a la insulina, el efecto de ésta en el organismo es menor, lo que provoca una menor activación (fosforilación) de AKT (26).

Resultados y discusión

En la *Figura 25* se puede observar que la expresión proteica de pAKT aumenta tras el tratamiento con insulina tanto en las células control como en aquellas que presentan valores de *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresados, si bien las diferencias solo llegan a ser estadísticamente significativas en el grupo control, lo que podría indicar que estas células presentan una sensibilidad ligeramente superior a la insulina. No obstante, hay que tener muy presente que el número de muestras utilizado en este experimento es muy bajo, por lo tanto, no es posible afirmar nada con rotundidad.

La proteína AMPK es una de las principales enzimas reguladoras del balance energético y su activación, también por fosforilación, juega un papel importante en la regulación de la lipogénesis, lipólisis y oxidación de ácidos grasos (27). Esta proteína es un sensor que, ante un incremento en la ratio AMP:ATP o ADP:ATP, se activa disminuyendo los procesos en los que se consume ATP para mantener el balance energético. En mamíferos se sabe que la enzima AMPK juega un papel clave en el metabolismo de lípidos fosforilando proteínas o modulando la transcripción de genes en tejidos específicos como hígado, grasa o músculo. Se ha demostrado que AMPK está relacionada con la lipogénesis *de novo*, y por lo tanto con la síntesis de ácidos grasos, puesto que modula la actividad de la enzima ACC que es clave en esta ruta metabólica. En concreto, la AMPK, fosforila a ACC inhibiendo de este modo su actividad y por lo tanto la lipogénesis *de novo* (27) (28). Esto se traduce en que elevados valores de pAMPK inducen altos valores de pACC lo que da lugar a una inhibición de la lipogénesis *de novo* ya que impiden la transformación de acetil-CoA a malonil-CoA (29). Por otro lado, y continuando en la ruta de la lipogénesis *de novo*, la enzima FAS actúa sobre el malonil-CoA permitiendo su transformación a palmitato mediante la oxidación de NADPH y traduciéndose por tanto este proceso en la estimulación de la lipogénesis *de novo* y como consecuencia en la acumulación de lípidos (30).

Resultados y discusión

En el caso de la expresión proteica de pAMPK no se observan diferencias entre el grupo control y el grupo con valores elevados de *miR-141* y *miR-200c* en condiciones basales, sin embargo, tras un tratamiento con insulina se produce un aumento en ambos grupos celulares pero que sólo llega a ser estadísticamente significativo en el grupo control, aunque no podemos descartar que con un n mayor se observen cambios significativos. En cuanto a los valores de pACC, podemos ver que sólo se produce un incremento, sin llegar a ser estadísticamente significativo, en el grupo de células con *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresados.

La expresión proteica de FAS tiende a aumentar tras el tratamiento con insulina y a disminuir en las células que presentan *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresados, sin embargo, en ninguna de estas circunstancias las diferencias llegan a ser estadísticamente significativas.

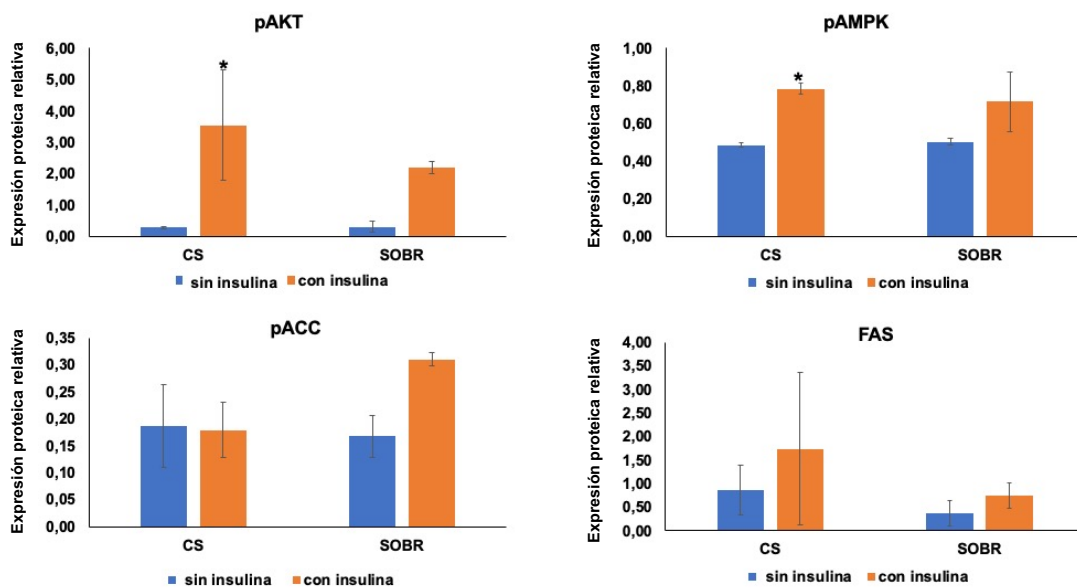


Figura 25. Expresión proteica de las enzimas pAKT, pAMPK, pACC y FAS en células 3T3-L1 control (CS) y con los miARNs *miR-141* y *miR-200c* sobreexpresados (SOBR). Las barras azules representan células sin tratamiento con insulina y las barras naranjas con tratamiento con insulina aguda (100 nM durante 5 minutos). N=2. Las barras representan la media \pm desviación estándar. * $P < 0,05$ por el tratamiento con insulina dentro de las células control o dentro de las células con miembros de la familia *miR-200* sobreexpresados. ANOVA de dos vías con un test Tukey post-hoc.

4.4. Experimento 4. Resultado de la inhibición de *miR-200b* en la ruta de señalización de la insulina y la lipogénesis *de novo*

Para llevar a cabo este experimento se realizó el cultivo celular y la diferenciación de las células del mismo modo que en los experimentos previos, y al igual que en el **Experimento 3**, parte de las células se trataron con insulina de modo agudo y se realizó la cuantificación de las mismas proteínas utilizando la técnica *Western blot*. Los resultados obtenidos se pueden observar en las *Figuras 26 y 27*.

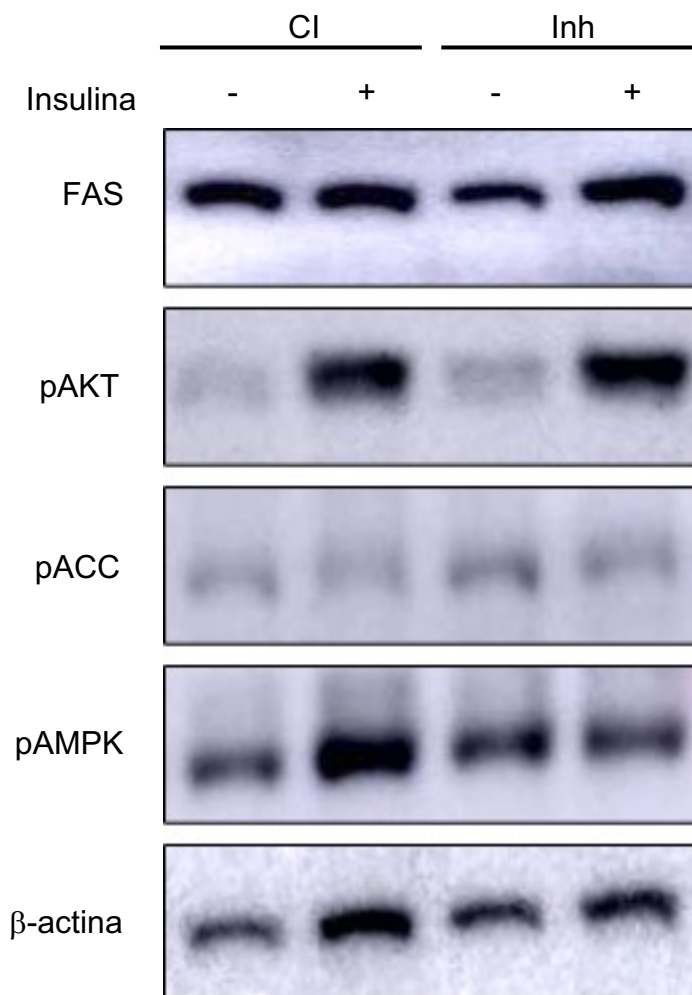


Figura 26. *Western blot* representativo de las proteínas FAS, pAKT, pACC, pAMPK y β -actina en células 3T3-L1 control y con el miARN *miR-200b* inhibido con y sin tratamiento con insulina (100 nM durante 5 minutos).

Resultados y discusión

En las *Figuras 26 y 27*, se puede observar que la expresión proteica de pAKT aumenta más del triple tras el tratamiento con insulina independientemente de la inhibición de *miR-200b*, sin embargo, las diferencias solo llegan a ser estadísticamente significativas tras la inhibición de *miR-200b*. En estado basal, los valores de pAKT también son ligeramente superiores en las células que presentan *miR-200b* inhibido, pero nuevamente no hay diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la expresión proteica de pAMPK se observa un ligero incremento tras la inhibición de *miR-200b* en condiciones basales, al igual que ocurre con pACC, si bien en ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas. Tras el tratamiento con insulina, únicamente las células control presentan un aumento en la activación de pAMPK, sin embargo, este aumento no se ve traducido en un aumento de los valores de pACC. La expresión proteica de FAS aumenta de modo estadísticamente significativo en ambos grupos de células tras el tratamiento con insulina y tanto en estado basal, como tras la estimulación con insulina, presenta valores ligeramente superiores cuando *miR-200b* está inhibido, sin embargo, en ninguna de estas circunstancias las diferencias llegan a ser estadísticamente significativas.

Resultados y discusión

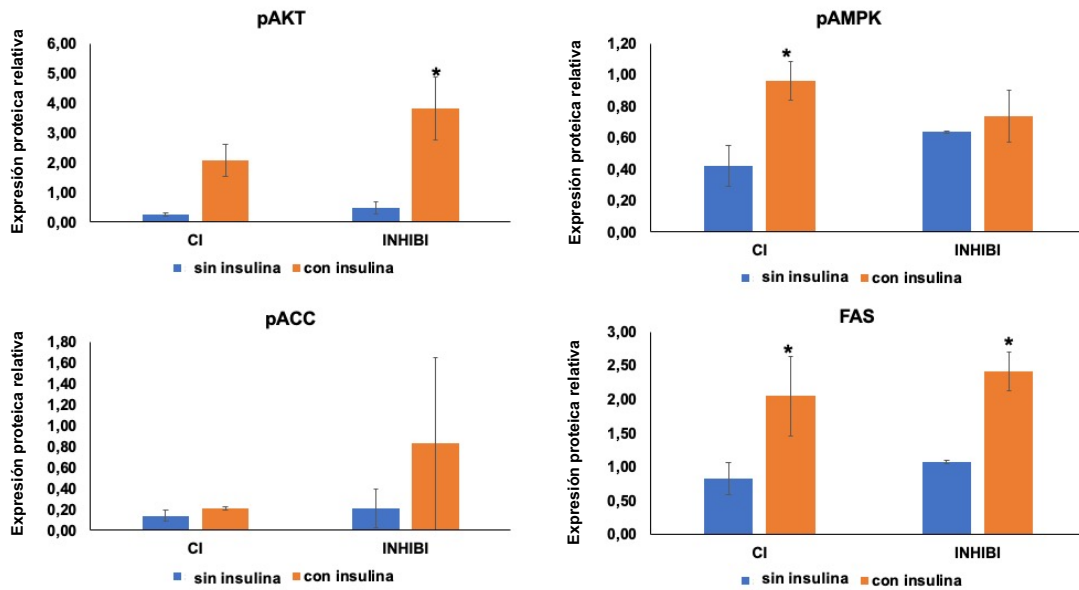


Figura 27. Expresión proteica de las enzimas pAKT, pAMPK, pACC y FAS en células 3T3-L1 control (CI) y con el miARN miR-200b inhibido (INHIBI). Las barras azules representan células sin tratamiento con insulina y las barras naranjas con tratamiento con insulina aguda (100 nM durante 5 minutos). N=2. Las barras representan la media \pm desviación estándar. * $P < 0,05$ por el tratamiento con insulina dentro de las células control o dentro de las células con el miembro de la familia miR-200 inhibido. ANOVA de dos vías con un test Tukey post-hoc.

Los resultados del análisis de la expresión proteica parecen sugerir que la sobreexpresión de miembros de la familia *miR-200* inhibe los niveles de la enzima FAS mientras que la inhibición de miembros de esta familia produce una estimulación de la misma, lo que coincidiría con los resultados obtenidos en los experimentos de Oil Red-O y el número de adipocitos maduros presentes en las muestras. Todos estos datos apoyarían un papel de la familia *miR-200* en la adipogénesis. Centrando la atención en pAKT, todo parece indicar que la sobreexpresión de *miR-141* y *miR-200c* provoca una menor sensibilidad a la insulina y que la inhibición de *miR-200b* la incrementa.

Los resultados mostrados hasta el momento son compatibles con los obtenidos previamente por otros autores. Tao *et al.* demostraron que ratones *knockout* (KO) para *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-429* en adipocitos, presentan un mayor peso corporal cuando se alimentan con dieta alta en

Resultados y discusión

grasa en comparación a ratones control, debido a un aumento del tejido adiposo (25). Por otra parte, Guo *et al.* constataron que existe una acumulación superior de lípidos a nivel hepático cuando se inhiben *miR-200b* y *miR-200c* (24).

A nivel periférico apenas existen datos de la implicación de la familia *miR-200* con la ruta de señalización de la insulina. Sin embargo Dou *et al.* observaron que la inhibición de *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-200c* a nivel hepático produce resistencia a la insulina (23). Los resultados obtenidos en este trabajo parecen contradictorios con los obtenidos por Dou y colaboradores, sin embargo no se puede descartar que existan diferencias tejido-específicas. Además, como ya se ha mencionado, una de las limitaciones de este trabajo de fin de máster es el bajo número de muestras que hay en cada grupo en los análisis de expresión proteica, que es igual a 2, lo que limita mucho sacar conclusiones y, por otro lado, en este trabajo sólo se tienen datos de las formas fosforiladas tanto de AKT, como de ACC y AMPK, cuando lo ideal habría sido estudiar también la cantidad de proteína total de cada enzima para así poder establecer una ratio entre la cantidad de proteína fosforilada con respecto a la total, pero la falta de esta ratio y el número de muestras suponen una limitación importante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados.

Si bien es cierto que la relación de los miembros de esta familia de miARNs con las distintas rutas metabólicas se debe estudiar más en profundidad, a la vista de los presentes resultados, así como los resultados de los estudios de la bibliografía consultada, se puede concluir que la familia *miR-200* parece tener implicación en la adipogénesis, así como en la sensibilidad a la insulina, resultando perjudiciales para ambos procesos valores de expresión elevados de distintos miembros de esta familia.

5. Conclusiones

Las conclusiones que se pueden deducir del presente trabajo son:

1. La familia *miR-200* tiene un efecto directo en la adipogénesis. Mientras que un aumento en su expresión inhibe la adipogénesis, la inhibición de su expresión la estimula.
2. La familia *miR-200* tiene un efecto directo en la sensibilidad a la insulina. Altos niveles de expresión de distintos miembros de esta familia provocan una mayor resistencia a la insulina, mientras que la inhibición de su expresión provoca una mayor sensibilidad a la misma.

6. Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Lecube A, Monereo S, Rubio MÁ, Martínez-de-Icaya P, Martí A, Salvador J, et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. 2017 Mar 1;64:15–22.
3. Castilla Rodríguez I, García Lorenzo B. Informe sobre la efectividad y coste-efectividad de intervenciones para el tratamiento de la obesidad en adultos en atención primaria.
4. Oyarce Merino K, Valladares Vega M, Elizondo-Vega R, Obregón AM. Eating behavior in children. Vol. 33, *Nutrición Hospitalaria*. Grupo Aula Medica S.A.; 2016. p. 1461–9.
5. Rosales Ricardo Y. Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos; una revisión. Vol. 27, *Nutrición Hospitalaria*. 2012. p. 1803–9.
6. Rubio MA, Salas-Salvadó J, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D, et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica.
7. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. Vol. 7, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
8. Vishvanath L, Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. Vol. 129, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2019. p. 4022–31.

Bibliografía

9. Gharanei S, Shabir K, Brown JE, Weickert MO, Barber TM, Kyrou I, et al. Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020.
10. Rodríguez, R. Regulación de la adipogénesis y termogénesis por APC/C-CDH1: consecuencias fisiológicas in vivo. [Tesis doctoral]. Salamanca: 2018.
11. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis [Internet]. 2000. Available from: www.genesdev.org
12. Rodríguez, ML. Diferenciación adipocitaria y factores reguladores de la biogénesis mitocondrial. Efectos de los fármacos antiretrovirales. [Tesis doctoral]. Barcelona: 2002.
13. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. Vol. 219, Acta Physiologica. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 346–61.
14. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: Regulating the regulators. Vol. 48, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2013. p. 51–68.
15. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. Achievements in the Life Sciences. 2016 Dec;10(2):175–86.
16. Basak A. MicroRNA and Adipogenesis. En: Basak A, Atilla E. editores. Obesity and Lipotoxicity, Advances in Experimental Medicine and Biology. Suiza: Springer; 2017. p. 489-509.
17. Mao Y, Chen W, Wu H, Liu C, Zhang J, Chen S. Mechanisms and functions of miR-200 family in hepatocellular carcinoma. OncoTargets and Therapy. 2020;13:13479–90.
18. Guru A, Issac PK, Velayutham M, Saraswathi NT, Arshad A, Arockiaraj J. Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. Vol. 48, Molecular Biology Reports. Springer Science and Business Media B.V.; 2021. p. 743–61.

Bibliografía

19. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. Vol. 9, Nat Methods. 2012.
20. Ganju A, Khan S, Hafeez BB, Behrman SW, Yallapu MM, Chauhan SC, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer. Vol. 22, Drug Discovery Today. Elsevier Ltd; 2017. p. 424–32.
21. de Sousa MC, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.
22. Fontana A, Barbaro R, Dama E, Pasculli B, Rendina M, Morritti MG, et al. Combined analysis of miR-200 family and its significance for breast cancer. Scientific Reports. 2021 Dec 1;11(1).
23. Dou L, Zhao T, Wang L, Huang X, Jiao J, Gao D, et al. MiR-200s contribute to interleukin-6 (IL-6)-induced insulin resistance in hepatocytes. Journal of Biological Chemistry. 2013 Aug 2;288(31):22596–606.
24. Guo J, Fang W, Sun L, Lu Y, Dou L, Huang X, et al. Reduced miR-200b and miR-200c expression contributes to abnormal hepatic lipid accumulation by stimulating JUN expression and activating the transcription of srebp1 [Internet]. Vol. 7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
25. Tao C, Ren H, Xu P, Cheng J, Huang S, Zhou R, et al. Adipocyte miR-200b/a/429 ablation in mice leads to high-fat-diet-induced obesity [Internet]. Vol. 7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
26. Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. Vol. 19, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2018. p. 654–72.
27. Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. Vol. 42, Cell Biology International. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 384–92.

Bibliografía

28. Wang Q, Liu S, Zhai A, Zhang B, Tian G. AMPK-Mediated Regulation of Lipid Metabolism by Phosphorylation. Vol. 41, Biol. Pharm. Bull. 2018.
29. Rodríguez C, Muñoz M, Contreras C, Prieto D. AMPK, metabolism, and vascular function. Vol. 288, FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 3746–71.
30. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. Biochemical Society Transactions. 2002 Nov 30;1059–64.